



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL

ENGENHARIA DE AQUICULTURA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ANDREIA BEZ MORAES

**Análise do Efeito da Contaminação do Glifosato no Camarão de Água
Doce *Macrobrachium rosenbergii*: Efeito Letal, Neurotóxico e sobre o
Sistema Antioxidante**

LARANJEIRAS DO SUL

2018

ANDREIA BEZ MORAES

**Análise do Efeito da Contaminação do Glifosato no Camarão de Água
Doce *Macrobrachium rosenbergii*: Efeito Letal, Neurotóxico e sobre o
Sistema Antioxidante**

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
curso de Engenharia de Aquicultura da Universidade
Federal da Fronteira Sul, como requisito para
obtenção do título de bacharel em Engenharia de
Aquicultura.**

Orientadora Prof. Dr^a. Silvia Romão

LARANJEIRAS DO SUL

2018

, Andreia Bez Moraes

Análise do Efeito da Contaminação do Glifosato no Camarão de Água Doce *Macrobrachium rosenbergii*: Efeito Letal, Neurotóxico e sobre o Sistema Antioxidante/ Andreia Bez Moraes . -- 2018.

64 f.:il.

Orientadora: Silvia Romão.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Engenharia de Aquicultura , Laranjeiras do Sul, PR, 2018.

1. Efeito da Contaminação do Glifosato . 2. Efeito Letal. 3. Neurotóxico . 4. Sistema Antioxidante. I. Romão, Silvia, orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

ANDREIA BEZ MORAES

**Análise do Efeito da Contaminação do Glifosato no Camarão de Água
Doce *Macrobrachium rosenbergii*: Efeito Letal, Neurotóxico e sobre o
Sistema Antioxidante**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Engenharia de Aquicultura da Universidade Federal da Fronteira sul.

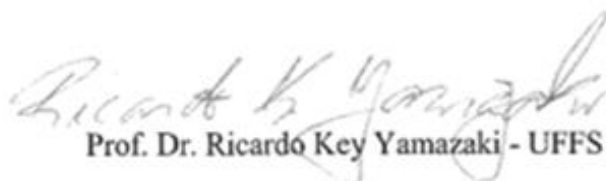
Orientadora Prof. Dr^a. Silvia Romão

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e

aprovado pela banca em: 29/06/2018

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr^a. Silvia Romão – UFFS


Prof. Dr. Ricardo Key Yamazaki - UFFS


Prof. Dr^a. Luisa Helena Cazarolli – UFFS

Dedico este trabalho a minha família e ao Elias pelo apoio, ajuda, paciência e compreensão durante sua elaboração e ao longo do curso de Engenharia de Aquicultura.

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares e ao Elias pelo apoio e ajuda prestada durante a elaboração deste projeto e do curso de Engenharia de Aquicultura, aos meus colegas do curso, pela amizade, pelas conversas e pelo tempo de convívio; aos colegas que me ajudaram na realização das análises e do experimento. À professora Silvia Romão, pela ajuda, sugestões e correções na elaboração deste trabalho. Ao professor Alexandre Manoel dos Santos pela ajuda na realização da estatística do experimento. À professora Luisa Helena Cazarolli e ao professor Ricardo Key Yamazaki por aceitarem participar da banca e pelas sugestões e correções do trabalho.

Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os
sonhos não têm alicerces. Sem prioridade, os
sonhos não se tornam reais.

(Augusto Cury)

RESUMO

O Brasil é um país agrícola, fazendo uso de diversos insumos químicos, entre esses destaca-se o Glifosato, altamente utilizado em lavouras de soja e milho, mas com risco potencial de contaminação de solo e água das áreas rurais. O aumento do cultivo continental do Camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii*, em regiões próximas a grandes áreas rurais leva ao questionamento sobre o efeito da contaminação por glifosato nestes animais. Devido a isso esse trabalho teve o objetivo de analisar o efeito do glifosato sobre a mortalidade e fisiologia do camarão de água doce *M. rosenbergii*, através de ensaio de CL50 por período de 96 horas com concentrações de 0, 10, 50, 100 e 150 mg/L de glifosato e ensaio de curto prazo, com contaminação de 100mg/L de glifosato em períodos de exposição de 2, 6, 9 e 24 horas. Em ambos os ensaios foi realizada coleta de hepatopâncreas e músculo para análises de marcadores bioquímicos de neurotoxicidade (colinesterase) e do sistema antioxidante (LPO e enzimas catalase, GST e GR). Os animais submetidos a 150 mg/L de glifosato apresentaram 100 % de mortalidade. As demais concentrações apresentaram porcentagens parciais de mortalidade. A CL50 foi determinada através da ferramenta estatística Probit, determinando as concentrações de 125,63 mg/L em 48 horas, 68,38 mg/L em 72 horas e 52,52 mg/L em 96 horas. Em animais sobreviventes ao ensaio CL50, não foi observada variação de atividade da colinesterase, LPO, catalase e GR de músculo e hepatopâncreas dos sobreviventes, porém houve redução da atividade da enzima GST em músculo de animais submetidos a 10 mg/L de glifosato e também foi observado agitação, seguida de paralisia nos animais em período de 2 a 10 horas após a contaminação. Animais submetidos a ensaio curto prazo de exposição ao glifosato apresentaram paralisia em 2, 6 e 9 horas após a contaminação, retornando ao padrão de movimentação semelhante ao controle em 24 horas, o que se assemelhou à alterações de comportamento percebidos na CL50. A atividade da GST em hepatopâncreas após 2, 9 e 24 horas de contaminação apresentou-se aumentada. Os animais também apresentaram inibição da colinesterase em hepatopâncreas em 2 (58,27%), 6 (81,96%) e 9 horas (22,9%) após a contaminação, sendo a inibição máxima encontrada em 6 horas e ausência de inibição observada após 24 horas. Em relação a enzima catalase de hepatopâncreas, houve elevação da atividade em 2 horas de contaminação. Não foi observada alterações de LPO e da atividade da enzima GR de músculo e hepatopâncreas ao longo do ensaio. Os valores de CL50 encontrados indicam que o glifosato é tóxico para *M. rosenbergii*. A inibição da colinesterase, aliados a alteração de motilidade e ao aumento na atividade da GST quando os animais foram expostos a curto período de contaminação, indicam que há simultaneamente a inibição da colinesterase uma indução de reação de biotransformação do glifosato via GST, reduzindo, com isso, o efeito neurotóxico do glifosato, com retorno a atividade da colinesterase e do comportamento natatório aos níveis observados nos animais controles em curto prazo após a contaminação.

Palavras-Chave: Agrotóxico. Estresse Oxidativo. Enzimas. Camarão. Contaminação.

ABSTRACT

Brazil is an agricultural country, making use of several chemical inputs, among which stands out Glyphosate, highly used in soybean and corn crops, but with potential risk of contamination of soil and water in rural areas. The increase of the continental cultivation of Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii* in regions close to large rural areas leads to questioning about the effect of glyphosate contamination in these animals. The objective of this work was to analyze the effect of glyphosate on the mortality and physiology of freshwater prawn *M. rosenbergii* by means of the LC50 assay for 96 hours at concentrations of 0, 10, 50, 100 and 150 mg / L glyphosate and short-term test with 100 mg / L glyphosate contamination at 2, 6, 9 and 24 hour exposure periods. Em ambos os ensaios foi realizada coleta de hepatopâncreas e músculo para análises de marcadores bioquímicos de neurotoxicidade (colinesterase) e do sistema antioxidante (LPO e enzimas catalase, GST e GR). Os animais submetidos a 150 mg/L de glifosato apresentaram 100 % de mortalidade. The other concentrations had partial mortality rates. The LC50 was determined using the Probit statistical tool, determining the concentrations of 125.63 mg / L in 48 hours, 68.38 mg / L in 72 hours and 52.52 mg / L in 96 hours. In animals surviving the LC50 assay, no variation in cholinesterase activity, LPO, catalase and muscle GR and hepatopancreas of the survivors was observed, but there was a reduction in GST enzyme activity in muscle from animals submitted to 10 mg / L glyphosate and also agitation was observed, followed by paralysis in the animals from 2 to 10 hours after contamination. Animals undergoing short-term exposure to glyphosate showed paralysis at 2, 6 and 9 hours after contamination, returning to similar movement pattern at 24 hours, which was similar to behavioral changes perceived in LC50. The GST activity in hepatopancreas after 2, 9 and 24 hours of contamination was increased. The animals also had cholinesterase inhibition in hepatopancreas in 2 (58.27%), 6 (81.96%) and 9 hours (22.9%) after contamination, with maximum inhibition found at 6 hours and absence of inhibition observed after 24 hours. In relation to the catalase enzyme of hepatopancreas, there was elevation of the activity in 2 hours of contamination. No changes in LPO and muscle GR and hepatopancreas activity were observed throughout the trial. The LC50 values found indicate that glyphosate is toxic to *M. rosenbergii*. Inhibition of cholinesterase, together with altered motility and increased GST activity when the animals were exposed to a short period of contamination, indicate that inhibition of cholinesterase induces the biotransformation reaction of glyphosate via GST, This is the neurotoxic effect of glyphosate, with a return to cholinesterase activity and swimming behavior at the levels observed in the control animals in the short term after contamination.

Keywords: Agrotoxic. Oxidative stress. Enzymes. Shrimp. Contamination.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais estruturas do <i>M. rosenbergii</i>	19
Figura 2. Montagem do Sistema para o ensaio de CL 50	26
Figura 3. Centrífuga utilizada no processo de Preparo das Amostras	28
Figura 4. Banho Maria e Leitora de Microplaca	31
Figura 5. Esquema para microplaca	31
Figura 6. Registro de número de mortes e porcentagens finais de mortes, nos diferentes grupos experimentais durante 96 horas de Ensaio de CL50	32
Figura 7. Estimativa da curva probit, no período de 72 horas	33

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

CAT – Catalase

CL 50 – Concentração letal 50%

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

GPx – Glutathione peroxidase

GR – Glutathione reductase

GSH – Glutathione reduzida

GSSG – Glutathione oxidada

GST – Glutathione S transferase

LPO – Peroxidação lipídica

SNC – Sistema nervoso central

SOD – Superóxido dismutase

UFFS – Universidade Federal da Fronteira Sul

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Atividade da Colinesterase em Hepatopâncreas de <i>Macrobrachium rosenbergii</i> submetidos a ensaio de CL50.....	34
Gráfico 2 – Atividade da Colinesterase em Músculo de <i>Macrobrachium rosenbergii</i> submetidos a ensaio de CL50.....	34
Gráfico 3 – LPO em Hepatopâncreas de <i>Macrobrachium rosenbergii</i> submetidos a ensaio de CL50.....	35
Gráfico 4 – LPO em Músculo de <i>Macrobrachium rosenbergii</i> submetidos a ensaio de CL50.....	36
Gráfico 5 - Atividade da Catalase em Hepatopâncreas de <i>Macrobrachium rosenbergii</i> submetido a ensaio CL 50.....	37
Gráfico 6 - Atividade da Catalase em Músculo de <i>Macrobrachium rosenbergii</i> submetidos a ensaio de CL50.....	37
Gráfico 7 – Atividade da GST em Músculo de <i>Macrobrachium rosenbergii</i> submetidos a ensaio de CL 50.....	38
Gráfico 8 – Atividade da GR em Músculo de <i>Macrobrachium rosenbergii</i> submetidos a ensaio de CL 50.....	39
Gráfico 9 – Atividade da Colinesterase em Hepatopâncreas de <i>Macrobrachium rosenbergii</i> submetidos a ensaio de curto prazo com concentração de 100 mg/L de glifosato.....	40
Gráfico 10 – Atividade da Colinesterase em Músculo de <i>Macrobrachium rosenbergii</i> submetidos a ensaio de curto prazo com concentração de 100 mg/L de glifosato.....	41
Gráfico 11 – LPO em Hepatopâncreas de <i>Macrobrachium rosenbergii</i> submetidos a ensaio de curto prazo com concentração de 100 mg/L de glifosato no período.....	41

Gráfico 12 - LPO em Músculo de <i>Macrobrachium rosenbergii</i> submetidos a ensaio de curto prazo com concentração de 100 mg/L de glifosato.....	42
Gráfico 13 – Atividade da Catalase em Hepatopâncreas de <i>Macrobrachium rosenbergii</i> submetidos a ensaio de curto prazo com 100 mg/L de glifosato.....	43
Gráfico 14 – Atividade Catalase em Músculo de <i>Macrobrachium rosenbergii</i> submetidos a ensaio de curto prazo com 100 mg/L de glifosato.....	43
Gráfico 15 – Atividade da GST em Hepatopâncreas de <i>Macrobrachium rosenbergii</i> submetidos a ensaio de curto prazo com 100 mg/L de glifosato.....	44
Gráfico 16 – Atividade da GST em Músculo de <i>Macrobrachium rosenbergii</i> submetidos a ensaio de curto prazo com 100 mg/L de glifosato.....	45
Gráfico 17 – Atividade da GR em Hepatopâncreas de <i>Macrobrachium rosenbergii</i> submetidos a ensaio de curto prazo com 100 mg/L de glifosato.....	46
Gráfico 18 – Atividade da GR em Músculo de <i>Macrobrachium rosenbergii</i> submetidos a ensaio de curto prazo com 100 mg/L de glifosato.....	46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS.....	16
1.1.1 Objetivo geral.....	16
1.1.2 Objetivos específicos.....	17
2. JUSTIFICATIVA	17
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
3.1 CAMARÃO DE ÁGUA DOCE.....	18
3.1.1 Demanda de Produção.....	19
3.2 GLIFOSATO.....	20
3.2.1 Estrutura química.....	20
3.2.2 Uso de Glifosato para aumento de produção.....	21
3.2.3 Efeitos Tóxicos.....	22
3.3 COLINESTERASE.....	22
3.4 ESTRESSE OXIDATIVO.....	24
3.5 CL 50.....	25
4. METODOLOGIA	25
4.1 ENSAIO CL 50 DE EXPOSIÇÃO AO GLIFOSATO.....	25
4.1.1 Sistema.....	25
4.2 MONTAGEM DO ENSAIO DE EXPOSIÇÃO DE CURTO PRAZO AO GLIFOSATO.....	27
4.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	27
4.3.1 Preparo das Amostras.....	27
4.3.2 Metodologias das análises bioquímicas.....	28
4.3.2.1 Proteína.....	28
4.3.2.2 Colinesterase.....	28
4.3.2.3 LPO.....	29

4.3.2.4 Catalase.....	29
4.3.2.5 Glutathiona transferase (GST)	30
4.3.2.6 Glutathiona redutase (GR)	30
4.3.3 Análises Estatísticas.....	32
5. RESULTADOS.....	32
5.1 ENSAIO CL 50.....	32
5.1.1 Colinesterase em hepatopâncreas e Músculo Ensaio CL 50.....	33
5.1.2. LPO em Hepatopâncreas e Músculo Ensaio CL50.....	35
5.1.3 Catalase em Hepatopâncreas e Músculo Ensaio CL50.....	36
5.1.4 GST em Músculo Ensaio CL50.....	38
5.1.5 GR em Músculo Ensaio CL 50.....	38
5.2 ENSAIO CURTO PRAZO.....	39
5.2.1 Colinesterase em Hepatopâncreas e Músculo Ensaio Curto Prazo.....	39
5.2.2 LPO em Hepatopâncreas e Músculo Ensaio Curto Prazo.....	41
5.2.3 Catalase em Hepatopâncreas e Músculo Ensaio Curto Prazo.....	42
5.2.4 GST em Hepatopâncreas e Músculo Ensaio Curto Prazo.....	44
5.2.5 GR em Hepatopâncreas e Músculo Ensaio Curto Prazo.....	45
6. DISCUSSÃO.....	47
7. CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS.....	56

1. INTRODUÇÃO

Atualmente o consumo de herbicidas tem crescido muito no Brasil devido ao aumento de áreas agrícolas, modernização do campo e menor utilização de mão de obra. Culturas como soja, milho, cana-de-açúcar e arroz utilizam mais de 80% dos herbicidas comercializados (OLIVEIRA JUNIOR, 2017). Segundo Bortoletto (2010), os agrotóxicos mais utilizados no Brasil são os herbicidas, uma vez que se fez necessário um crescimento na produtividade e conseqüentemente um aumento do uso de insumos químicos.

São considerados agrotóxicos todos os compostos químicos utilizados em atividade agrícolas. A utilização de herbicidas vem como uma possível solução para combater e controlar plantas daninhas consideradas como fatores de baixa produtividade. São compostos orgânicos sintéticos com pouca solubilidade em água (SOARES et al., 2017). No entanto, os herbicidas geram várias desvantagens tanto para o ambiente como para a saúde de pessoas e animais (COUTINHO et al., 2005).

Uma das atividades da aquicultura que vem se destacando é a carcinicultura (criação de camarões), pois esses animais possuem grande valor econômico (FREIRE e SILVA, 2008; NEGRINI, 2014). O *M. rosenbergii* é a espécie mais utilizada em projetos de cultivo de camarões de água doce. O cultivo desta espécie está sendo testado na região da Cantuquiriguaçu, podendo se tornar uma boa fonte de renda, principalmente para os pequenos produtores da região. Levando-se em consideração que as atividades agrícolas predominam na região e que experimentos de cultivo de camarão estão sendo desenvolvidos em áreas permeadas por lavouras com intenso uso de herbicidas, é de extrema importância que se estude o efeito letal e o comportamento fisiológico desses animais frente à contaminação com agrotóxicos no meio aquático.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Analisar o efeito da contaminação do glifosato sobre a mortalidade e parâmetros

fisiológicos em camarões de água doce (*M. rosenbergii*).

1.1.2 Objetivos específicos

- Realizar ensaio de CL50 em *M. rosenbergii* submetido ao glifosato para determinação de CL50 48, 72 e 96 horas.
- Determinar os efeitos de diferentes concentrações de glifosato sobre o sistema de defesa antioxidante de *M. rosenbergii* sobreviventes ao ensaio de CL50, através da atividade das enzimas Catalase, GST, GR e sobre o marcador de dano oxidativo LPO.
- Determinar os efeitos neurotóxicos de diferentes concentrações de glifosato de *M. rosenbergii* sobreviventes ao ensaio CL50, através da atividade colinesterase.
- Determinar o efeito do glifosato sobre o sistema de defesa antioxidante de *M. rosenbergii* através do acompanhamento da atividade das enzimas antioxidantes Catalase, GST, GR e sobre o marcador de dano antioxidante LPO, em ensaio de curto prazo, ao longo de 24 horas de contaminação.
- Determinar os efeitos neurotóxicos do glifosato em *M. rosenbergii* através do acompanhamento da atividade da enzima colinesterase, em ensaio de curto prazo, ao longo de 24 horas de contaminação.

2. JUSTIFICATIVA

Os agrotóxicos possuem o objetivo de eliminar determinados organismos, prejudicando muitas vezes espécies que não seriam seu principal alvo, como é o caso dos organismos aquáticos (PERSCH, 2015). O efeito da contaminação pelos agrotóxicos é extremamente prejudicial aos organismos aquáticos. Constantino (2007) ressalta a necessidade de pesquisas que relatem e determinem os reais efeitos que os agrotóxicos causam aos organismos afetados.

Os contaminantes químicos causam a mortalidade dos organismos que vivem em meios aquáticos, se ligando a partículas suspensas, se depositam nos sedimentos de fundo

ou simplesmente são absorvidos por organismos, sendo detoxificados ou acumulados, assim podendo prejudicar o sistema nervoso, osmorregulação, desenvolvimento e a reprodução de peixes (LANGIANO, 2006).

Conforme destaca Menezes (2010), o controle de plantas indesejáveis nas lavouras e nos ecossistemas aquáticos, é realizado com o uso de herbicidas, o que leva a inúmeros problemas que contaminam os ambientes. Outra condição que gera contaminação do ambiente aquático pelos produtos químicos é a aplicação destes produtos em áreas próximas aos recursos hídricos, bem como pelas enxurradas e infiltração no solo (PEREIRA, 2012).

Segundo Moraes (2010), o uso de glifosato tem crescido devido ao aumento de plantas transgênicas, havendo uma contaminação cada vez maior dos rios, lagos, reservatórios e dos lençóis freáticos pelos agrotóxicos. Pereira (2012) também relata que os recursos hídricos localizados em áreas rurais que fazem uso de agrotóxicos possuem altas taxas de contaminação. Já Sanchez (2015) considera que o glifosato é um produto que apresenta alta toxicidade a inúmeros organismos, inclusive àqueles que não fazem parte do seu objetivo de eliminação.

O aumento do cultivo continental de camarões de água doce, principalmente em áreas rurais, revela a necessidade de identificação de qual a interferência que o glifosato tem na sobrevivência, fisiologia e crescimento destes animais.

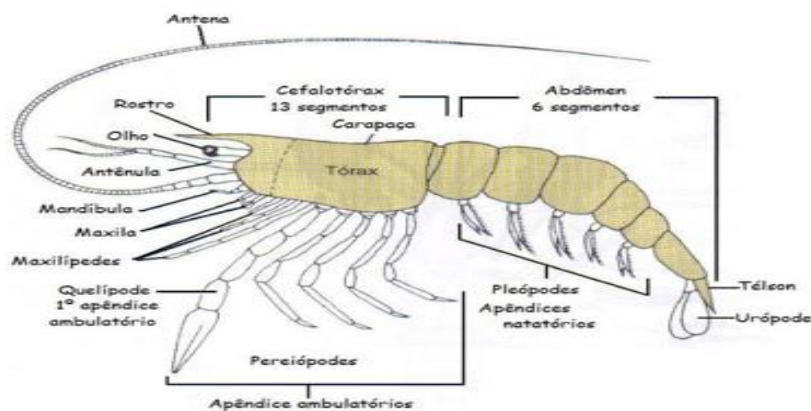
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 CAMARÃO DE ÁGUA DOCE

O camarão *M. rosenbergii* (gigante da malásia), é um crustáceo da família dos palemonídeos, espécie nativa da Ásia e da Austrália, introduzida no Brasil em 1977. Tem como principais características morfológicas o corpo acinzentado, com tamanho variando entre 23 a 33 centímetros, podendo chegar a 500 g de peso, contando com o segundo pereiópode em forma de quela com coloração azulada (PINHEIRO e HEBLING, 1998). Nos últimos anos assumiu um papel fundamental para o aumento da produção de camarão como fonte de proteínas na alimentação humana.

M. rosenbergii pertencente a macrofauna bentônica, se move com auxílio dos apêndices ambulatórios (pereiópodos), utilizando para nadar os apêndices abdominais (pleiópodos). Quando se sentem ameaçados contraem muito rápido a musculatura abdominal, nadando para trás muito rápido, também utiliza para esse movimento, o leque caudal. A faixa de temperatura ideal para essa espécie se encontra entre 28 a 30 °C. Em muitas situações de estresse como a falta de alimento, pode desencadear uma situação de canibalismo, entre os animais mais vulneráveis, como por exemplo durante a troca de carapaça (PINHEIRO e HEBLING, 1998). As principais estruturas do corpo do *M. rosenbergii* podem ser observadas na figura 1.

Figura 1. Principais estruturas do *M. rosenbergii*.



Fonte: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAfc2EAL/pratica-artropoda-crustacea>

3.1.1 Demanda de Produção

Atualmente no Brasil, o cultivo de camarões de água doce tem tido uma favorável expansão ocorrendo um grande aumento na demanda pelo produto, com uma favorável organização da cadeia produtiva (NEW, 2002).

Essa demanda aumentou a partir dos anos 90, onde ocorreu uma necessidade de adquirir outras fontes de proteína animal. Esse fato tem contribuído para o aumento das atividades aquícolas, incluindo a carcinicultura, vindo como alternativa de substituição

de carne proveniente de outras atividades pecuárias. O cultivo de camarões de água doce está em rápido desenvolvimento, podendo gerar uma alta produtividade (HELDT et al., 2012), sendo considerada atividade sustentável, uma vez que gera lucro, causa pouco impacto ambiental, além de gerar empregos e utilizar mão de obra familiar (NEW et al., 2000; VALENTI, 2000, 2002).

Na região da Cantuquiriguaçu o cultivo de *M. rosenbergii* tem sido implantado em alguns produtores em fase experimental, tendo-se obtido bons resultados tanto de produção quanto de retorno financeiro aos produtores, uma vez que o camarão se adapta bem a região, exceto em períodos frios.

3.2 GLIFOSATO

3.2.1 Estrutura química

O glifosato, também conhecido como N-(fosfometil)glicina é um herbicida pós-emergente, sistêmico, não seletivo, hidrossolúvel e de amplo espectro. A fórmula molecular do glifosato é $C_3H_8NO_5P$, é um sólido cristalino, solúvel em água, com densidade de $0,5 \text{ g/cm}^3$, sendo muito estável na presença de luz e de temperaturas acima de 60°C (AMARANTE JÚNIOR et al., 2002). O glifosato foi sintetizado a partir da troca de um hidrogênio amínico da glicina pelo radical metilfosfônico (COUTINHO et al., 2005).

Como herbicida, o glifosato inibe competitivamente uma enzima crítica da via do chiquimato, a 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPS), essa enzima desempenha um papel fundamental na biossíntese do intermediário corismato, necessário para a síntese dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano (AMARANTE JÚNIOR et al., 2005).

3.2.2 Uso de Glifosato para aumento de produção

Segundo Spadotto (2002), no Brasil em 2000 foram utilizados em média 174 mil toneladas de herbicidas, onde a região sul se destacou entre as regiões que fazem uso com 38,9%, a região centro-oeste com 29,9%, e a região sudeste com 22,8%. Os estados que mais utilizam herbicidas são o Paraná com 18,5%, o Rio Grande do Sul com 16,8%, São Paulo com 14,1%, Mato Grosso com 12,7%, Goiás com 10,1%, Minas Gerais com 7,4% e Mato Grosso do Sul com 7%.

O glifosato se encontra no mercado em concentrações de 48%, utilizado em quantidade aproximada de 5 L/ha. É um herbicida utilizado para controle de plantas daninhas anuais e perenes, é muito utilizado em culturas de café, arroz, milho, soja, fumo, pastagens, além de ser utilizado em culturas frutíferas como maçã, pêra, pêsego, entre outras. Também é indicado para o controle de plantas aquáticas indesejáveis (AMARANTE JÚNIOR et al., 2002).

Os herbicidas controlam as plantas indesejáveis em várias fases, mas principalmente no início do ciclo da cultura onde essas plantas acabam causando grandes perdas de produtividade. Esses agrotóxicos são recomendados devido a diminuição de custos que proporciona na mão de obra, na colheita e na secagem dos grãos (OLIVEIRA JUNIOR, 2017). A contaminação do ambiente aquático ocorre através do transporte pela água que infiltra e pelo movimento dessa água no solo, a intensidade da água da chuva que gera enxurradas, pela ação dos ventos e pela aplicação direta na água para o controle de macrófitas (ANNETT et al., 2014).

Segundo Coutinho et al., (2005) os agrotóxicos são utilizados em diversas culturas para aumentar a produção, mas acabam afetando outros organismos não alvos desses produtos químicos. O mesmo autor cita também que o Glifosato está entre os produtos mais utilizados no mundo. Uma vez que no Brasil são utilizadas diversas substâncias químicas nas lavouras, surge a importância de pesquisas sobre os danos que essas substâncias causam no ambiente, nos animais e nas pessoas.

3.2.3 Efeitos Tóxicos

Os herbicidas, assim como os agrotóxicos em geral, durante sua utilização acabam entrando em contato com o ambiente aquático. Agem nos organismos aquáticos causando efeitos subletais ou podendo causar a morte, sendo que esses impactos variam muito com tipo do ambiente afetado, com organismos que vivem nesses locais e com substâncias químicas contaminantes (MODESTO, 2009). Oliveira Junior (2017) afirma que atualmente os novos herbicidas tem um teor tóxico menor para os seres humanos e meio ambiente, mas mesmo assim continuam surgindo casos de problemas de saúde humana causados por agrotóxicos. De maneira geral, essas substâncias não permanecem no ambiente por um tempo indefinido, mas o tempo que permanecem já são capazes de causar grandes problemas.

Guimarães (1987) afirma que os principais parâmetros utilizados para determinação da toxicidade dos herbicidas no ambiente, vão desde o efeito causado nos peixes, animais e micro-organismos aquáticos até a quantidade de produto que foi utilizado. Para determinar os efeitos causados por agrotóxicos Constantino (2007) considera a importância do estudo envolvendo os bioindicadores, que viriam a ser uma forma de identificar os efeitos causados pelos agrotóxicos. Os bioindicadores são determinados através de diversos níveis, entre eles os bioquímicos, gerando os primeiros efeitos que podem ser observados nos organismos.

Os animais aquáticos apresentam sensibilidade elevada ao glifosato e aos seus componentes, pois este composto inibe algumas funções enzimáticas, causa problemas crônicos no nascimento em períodos de grande exposição, assim como apresenta grande toxicidade para bactérias e fungos (AMARANTE JÚNIOR et al., 2002).

3.3 COLINESTERASE

Um dos biomarcadores mais estudados em casos de contaminação por agrotóxicos é a atividade da acetilcolinesterase (MODESTO, 2009) ou a butirilcolinesterase (BChE) (STURM et al., 1999).

A acetilcolina é produzida no citoplasma das terminações nervosas e que atua como neurotransmissor no sistema nervoso central e periférico. A acetilcolina (ACh) é sintetizada nos terminais axonais a partir da colina e da acetil coenzima A, numa única reação enzimática, catalisada pela enzima colina-acetiltransferase. A reação produz acetilcolina e libera coenzima A. A acetilcolina fica armazenada em vesículas localizadas nos neurônios pré-sinápticos até ocorrer estímulo para que possa ser liberada na fenda sináptica, a ACh se liga ao receptor pós-sináptico gerando a informação e assim que a informação é transmitida a molécula de ACh se desliga do receptor pós-sináptico e volta à fenda sináptica passando por hidrólise catalisada pela AChE, formando ácido acético e colina que serão absorvidas pelo neurônio pré-sináptico e utilizadas para nova formação do neurotransmissor (ARAÚJO et al., 2016).

Quando a ACh é liberada pelos neurônios da placa motora, estimula as células musculares esqueléticas. No SNC, os sistemas acetilcolinérgicos existem no cerebelo, sistema reticular ascendente, tálamo e córtex cerebral, com atividades excitatórias e inibitórias (GOODMAN, GILMAN, 2005; MOTA et al., 2012). No sistema nervoso periférico a acetilcolina controla os impulsos nervosos, os batimentos cardíacos, a dilatação dos vasos sanguíneos e contração dos músculos, já no sistema nervoso central é responsável pelo controle motor, cognição e memória (PETRONILHO et al., 2011).

Para que exerça sua função corretamente, a acetilcolina, bem como os demais neurotransmissores, deve ser removida ou inativada de acordo com as demandas de tempo para cada resposta sináptica específica pretendida. Para tanto atua nesse processo a enzima acetilcolinesterase, que catalisa a hidrólise da acetilcolina, liberando colina no líquido extracelular. Esta enzima, abundante na fenda sináptica tem a função de rapidamente eliminar a acetilcolina liberada na sinapse. Dessa forma, essa enzima é capaz de modular a intensidade da resposta sináptica (GOODMAN, GILMAN, 2005), sendo importante para estudos relacionados à doença de Alzheimer e a diversas intoxicações por compostos químicos (PETRONILHO et al., 2011). A detecção do produto da reação das colinesterases é considerada como um excelente parâmetro para marcação da presença de organofosforados e carbamatos no ambiente, assim como do efeito neurotóxico deste composto (STURM et al., 1999).

3.4 ESTRESSE OXIDATIVO

Os radicais livres formam-se no metabolismo celular, em grande quantidade provocam oxidação de moléculas biológicas, a oxidação faz parte do metabolismo celular, os radicais livres são formados naturalmente, e são conhecidos como ERO (espécies reativas de oxigênio) (DUDA, 2013). A produção dos EROs está ligada a contaminação do ambiente, são gerados no metabolismo da célula pela transferência de elétrons da respiração mitocondrial (TRIVELLA, 2006). As enzimas antioxidantes atuam em reações químicas neutralizando espécies reativas de oxigênio no interior das células, impedindo possíveis danos (FERREIRA, 2010).

Dafre (2012) afirma que as análises bioquímicas são utilizadas como bioindicadores de exposição ou efeito e que enzimas antioxidantes são muito utilizadas. Vários contaminantes podem causar a formação de ERO, que interagem com lipídeos, proteínas e DNA, afetando suas estruturas e funções. O organismo se defende através de defesas antioxidantes, formadas pela defesa enzimática e não enzimática. Na defesa enzimática, as enzimas glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), superóxido desmutase (SOD) glutathione reductase (GR) e a glutathione-S-transferase (GST) catalisando reações que neutralizam as EROs. Conforme afirma Barbosa (2010), estas enzimas participam do sistema de defesa, agindo através da prevenção, evitando a geração de radicais livre e não-radicaís, que provocam efeitos oxidativos.

Na defesa não enzimática, vias metabólicas ou a dieta garantem a oferta de moléculas que atuam neutralizando as EROs, tais como glutathione reduzida (SANCHEZ, 2015; DUDA, 2013). Quando esses componentes de defesa não conseguem combater as EROs, é estabelecido o estresse oxidativo, podendo ocorrer inativação enzimática, dano ao DNA, peroxidação lipídica e morte celular (MODESTO, 2009). Na peroxidação lipídica (LPO) a reação dos lipídeos de membrana com os EROs, danifica as membranas celulares, prejudicando a funcionalidade das células (SANCHEZ, 2015). Um dos primeiros danos causados ao organismo na presença de substâncias contaminantes é a peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) (PIANCINI, 2015).

A SOD, catalisa a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (SANCHEZ, 2015). A catalase é uma enzima encontrada nos peroxissomas de células

aeróbias, estando presente em maior quantidade no fígado, rins e eritrócitos (FERREIRA, 2010). A CAT e a GPx atuam para evitar a acumulação de peróxido de hidrogênio no organismo. Para sua atividade, a GPx utiliza a GSH tornando-a oxidada (GSSG) (BARREIROS et al., 2006). A CAT catalisa a quebra do hidrogênio em água e oxigênio (MODESTO, 2009; SOUZA, 2010).

A GST (Glutathione-S-transferase), tem como função a detoxificação de substâncias tóxicas. A enzima catalisa a ligação da GSH (glutathione reduzida) com moléculas xenobióticas, tornando-as menos tóxicas, mais solúveis em água e mais degradáveis (TRIVELLA, 2006; COGO et al., 2009; FERREIRA, 2010; FIGUEIREDO, 2016; MODESTO, 2009) pela conjugação de moléculas orgânicas, com um centro eletrofílico reativo, com o grupo tiol do tripeptídeo glutathione na forma reduzida (GSH) (TRIVELLA, 2006). Menezes (2010), afirma a importância da GST em desintoxicar as células contaminadas com herbicidas.

A GR catalisa a redução da GSSG, regenerando GSH e com isso garantindo a manutenção da defesa antioxidante e de detoxificação com base na GSH (FERREIRA, 2010; MODESTO, 2009).

3.5 CL 50

A CL50 é um teste de toxicidade aguda usado para avaliar a exposição à compostos/substâncias químicas. A CL 50 é a concentração estimada do produto que causa a morte de 50% dos indivíduos testados (ANVISA, 2016). Os testes de toxicidade aguda têm duração de 96 horas onde os organismos testados ficam expostos ao produto contaminante. Na maioria das vezes esses testes apresentam resultados rápidos, tendo o objetivo de determinação da Concentração Letal Média (CL50) (LOMBARDI, 2004 apud ALBINATI, 2007).

4. METODOLOGIA

4.1 ENSAIO CL 50 DE EXPOSIÇÃO AO GLIFOSATO

4.1.1 Sistema

Para o ensaio de CL50 de camarão com glifosato foi montado um sistema no laboratório de patologia da UFFS, campus Laranjeiras do Sul, onde foram selecionados e pesados 70 juvenis de camarão *M. rosenbergii*, com peso médio de $0,493 \pm 0,148$ g, distribuídos em 15 grupos, aclimatados em aquários de 4 L, mantidos em ambientes individualizados (copos plásticos de 300 mL perfurados e recobertos com tela), para impedir o canibalismo característico da espécie (figura 2).

Figura 2. Montagem do Sistema para o ensaio de CL 50



Fonte: A. Autora, 2017.

Os animais foram divididos em 5 tratamentos: 0 (controle), 10 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L e 150 mg/L de glifosato, em triplicata. Os aquários foram selecionados aleatoriamente, numerados e identificados conforme o tratamento. Durante a aclimação foi renovada 30% da água dos aquários e ofertada ração 40% de proteína bruta, diariamente. Durante o período de ensaio (96 horas - 5 dias) foi realizada renovação diária de 30% de água, com a mesma concentração de glifosato, porém os animais não foram alimentados. Durante o período de ensaio foram registradas as mortes dos indivíduos de cada tratamento bem como realizado o acompanhamento de parâmetros de qualidade de água encontrando valores de temperatura $27,48^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0,59$), oxigênio $5,97$ mg/L ($\pm 0,51$), amônia $0,027$ mg/L ($\pm 0,005$) e pH $8,07$ ($\pm 0,21$).

Ao final do ensaio o número de mortes por tratamento foi utilizado para realizar a estimativa da CL50 através de sistema de análise PROBIT.

Após o período do ensaio, foram realizadas coletas de animais sobreviventes, em gelo, pesados e coletados os tecidos do hepatopâncreas e músculo. Os tecidos foram

embebidos em tampão PBS 7,2, mantidos em gelo, pesados e transferidos para microtubos, sendo congelados em temperatura de -85 °C em ultrafreezer. Para este ensaio foi realizado a análise de proteína, colinesterase, catalase, LPO, GST e GR do hepatopâncreas e do músculo.

4.2 MONTAGEM DO ENSAIO DE EXPOSIÇÃO DE CURTO PRAZO AO GLIFOSATO

O sistema foi montado utilizando 12 aquários de 4 L. Os 48 camarões com média de $1.156 \pm 0,501$ g. foram dispostos em 12 grupos de 4 animais em copos plásticos de 300 mL, com pequenos furos que possibilitaram a passagem de água livremente entre os copos. Os aquários foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos experimentais, 0 (controle) e 100 mg/L de glifosato. Os animais foram aclimatados por um período de 3 dias, após foi realizada a contaminação dos aquários com glifosato. Foram realizadas coletas de 6 animais controles e 6 animais contaminados com glifosato em períodos de 2, 6, 9 e 24 horas após a contaminação.

Em cada período do ensaio os animais foram pesados, eutanaziados em gelo e coletado os tecidos do hepatopâncreas e do músculo. Os tecidos foram pesados, transferidos para microtubos e armazenados em ultrafreezer em temperatura de -85 °C. Para este ensaio foi realizado a análise de proteína, colinesterase, catalase, LPO, GST e GR do hepatopâncreas e do músculo.

4.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

4.3.1 Preparo das Amostras

Para o preparo das amostras de tecidos, os mesmos foram homogeneizados em tampão PBS pH 7,2 (1:10 p/v), em banho de gelo. A seguir, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 11093 xg, a 4 °C (figura 3). O sobrenadante foi recolhido, separado em alíquotas e congelado para as análises posteriores.

Figura 3. Centrífuga utilizada no processo de Preparo das Amostras



Fonte: A.Autora, 2017.

4.3.2 Metodologias das análises bioquímicas

4.3.2.1 Proteína

As análises de proteína, LPO e enzimas foram realizadas em microplaca (figura 05), com incubação em banho-maria e leitura em espectrofotômetro de microplaca (figura 04). A determinação da concentração de Proteína foi realizada para o cálculo normalizado das demais análises. Proteínas totais dos tecidos foram determinadas pelo método de Bradford (1976).

4.3.2.2 Colinesterase

A análise da atividade da enzima colinesterase foi realizada por meio do método de Ellman et al., (1961), através da reação contínua do tiol com o íon 5:5-ditiobis-2-nitrobenzoato para produzir o ânion de coloração amarelada do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico. A análise foi realizada em triplicata, em 300 μ L de solução contendo 0,05 mM de ácido 5,5'-Ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) e 1,5mM de Acetilcolina (ATC) e 50 μ L de amostra. A reação foi acompanhada, em comprimento de onda de 415 nm por 3 minutos. Foi calculada a atividade da colinesterase em relação a concentração de

proteína (mg/mL), usando o coeficiente de extinção molar do DTNB ($1,36\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). A quantificação da proteína foi calculada a partir da amostra bruta e a leitura realizada a 22°C . Os resultados foram expressos em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$.

4.3.2.3 LPO

A LPO foi realizada pelo método de TBARS (FEDERICI, 2007), realizando comparações de absorvância com curvapadrão de Malondialdeído (MDA), principal subproduto de peroxidação lipídica celular. O MDA é produto da lipoperoxidação in vivo, reage com diversos compostos mensurados espectrofotometricamente, para sua determinação usa-se o ácido tiobarbitúrico (TBA) para a reação, que é baseada em 1 molécula de MDA com 2 moléculas de TBA, com eliminação de 2 moléculas de água, resultando em um pigmento rosa com absorção de 535 nm (FEDERICI, 2007). Para preparação da amostra foi utilizado microtubo onde foi pipetado 60 μL de amostra, em seguida foi acrescentado 120 μL de ácido tricloroacético (TCA) 10%, deixado em banho de gelo por 5 minutos e centrifugado por 5 minutos a 12000 $\times g$ a 4°C . Posteriormente para o ensaio da dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), 40 μL do sobrenadante, assim como de diferentes concentrações de MDA (curva) foram adicionados em microplaca, em triplicata, meio de reação contendo 21,42 mM de TBA, 17,86 mM de NaOH (utilizado para solubilização do TBA), 0,73 M de TCA, 0,032mM de BHT, etanol 3% (utilizado para solubilização do BHT) em PBS. A leitura da reação foi realizada à 22°C , após 60 minutos de incubação a 60°C , em uma absorvância de 535 nm. Os resultados da peroxidação lipídica foram expressos em nmol de MDA.mg de proteína⁻¹.

4.3.2.4 Catalase

A atividade da Catalase (CAT) foi determinada pelo decréscimo da absorvância a 240nm (Aebi, 1984), a partir do princípio de dismutação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, cujo coeficiente de extinção molar é de $40\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. As triplicatas foram

realizadas em placas UV com 96 poços de 300 μL , composto de meio de reação com concentrações finais de 13,5mM de H_2O_2 , 50mM de TRIS-HCl pH 8,0 e 0,25 mM de EDTA e 15 μL de amostra. A reação foi acompanhada por 2 minutos. Os resultados da atividade da enzima catalase foram expressos em mMol de peróxido de hidrogênio degradado. $\text{min}^{-1}.\text{mg}$ de proteína $^{-1}$.

4.3.2.5 Glutathione transferase (GST)

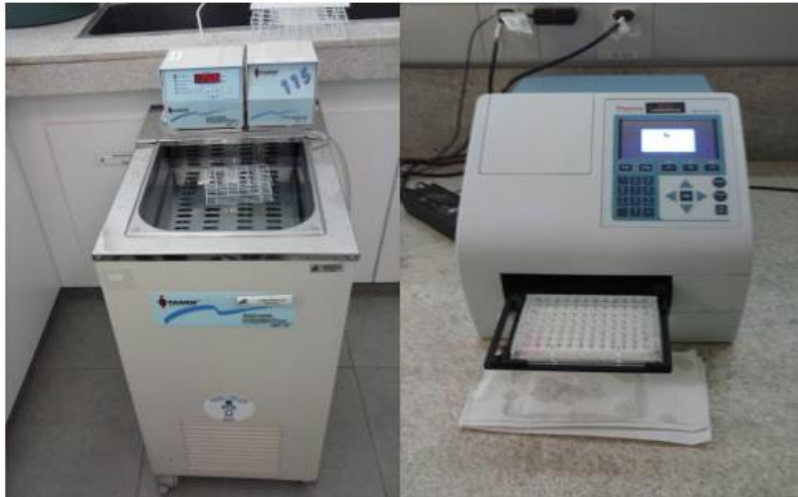
O princípio da atividade da Glutathione transferase (GST) é baseado no CDNB que é metabolizado pela GST conjugando a GSH, com aumento de absorvância em 340 nm. No ensaio a GST catalisa a conjugação da GSH com o substrato sintético 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) que produz um conjugado que é detectado em 340nm, onde a atividade enzimática é proporcional à velocidade de produção do composto conjugado (HABING et al., 1976). O ensaio foi realizado em triplicata, em microplaca UV, O meio de reação apresentou concentrações finais de 0,94 mM de CDNB, 0,94 mM de GSH e 10 μL de amostra. A leitura foi realizada à 22°C e acompanhada por leitura cinética em 340 nm, por 4 minutos com intervalo de 10 segundos. O coeficiente de extinção molar do conjugado GSH/CDNB é 9,6 $\text{mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ e a unidade foi expressa em $\text{mM}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{mg}$. proteína $^{-1}$.

4.3.2.6 Glutathione reductase (GR)

No princípio da glutathione reductase (GR), a glutathione oxidada (GSSG) é colocada no meio de reação logo após verificar-se sua redução (GSH), mediante ação da GR com oxidação do NADPH, o ensaio é uma medida indireta em registrar a diminuição (consumo) do NADPH em absorvância de 340 nm (CALBERG et al., 1985).O ensaio da Glutathione reductase foi realizado em triplicata, em microplaca UV, o meio de reação apresentou concentrações finais de 0,138 mM de NADPH, 3,81 mM de GSSG e 3,75 mM de EDTA e 10 μL de amostra. A reação foi realizada à 22°C, a leitura cinética teve duração de 8 minutos com intervalos de 10 segundos em 340 nm. O coeficiente de

extinção molar do NADPH é $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. A unidade foi expressa em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹.

Figura 4. Banho Maria e Leitora de Microplaca



Fonte: A. Autora, 2017.

Figura 5. Esquema para microplaca



Fonte: A. Autora, 2017.

4.3.3 Análises Estatísticas

Os resultados das análises bioquímicas dos ensaios CL50 e 24 horas, foram analisados no programa de estatística InStat Graph pad versão 3.01, onde diferenças significativas foram consideradas para $p < 0,05$. Foi realizado teste de homocedasticidade por Bartlett e normalidade por Kolmogorovand Smirnov demonstrando que a variância dos grupos foi semelhante e que há distribuição normal dos dados. Posteriormente foi realizado teste de variância por anova e em análises com diferenças significativas o pós teste de tukey.

5. RESULTADOS

5.1 ENSAIO CL 50

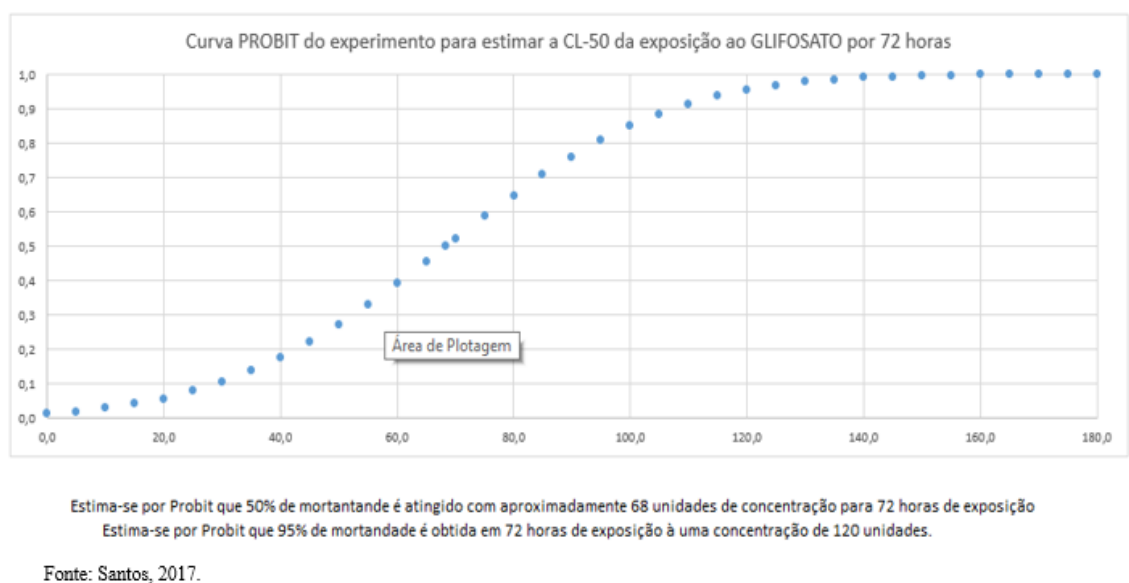
Foi observado efeito do glifosato sobre a sobrevivência dos animais submetidos às diferentes concentrações do composto ao longo das 96 horas de ensaio. Não foi observado morte de animais do grupo controle. Foi observado 100% de morte em animais submetidos a 150 mg/L de glifosato e porcentagens parciais de morte foram observadas nos grupos submetidos às demais concentrações do composto. A figura 8 representa o registro do número de mortes nos grupos experimentais submetidos às diferentes concentrações 0 (controle), 10, 50, 100 e 150 mg/L de glifosato no período de 96 horas.

Figura 6. Registro de número de mortes e porcentagens finais de mortes, nos diferentes grupos experimentais durante 96 horas de Ensaio de CL50.

Aq	mg.L	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	Mortes	Percentil
A11-a	0	0	0	0	0	0	0,00%
A12-a	0	0	0	0	0	0	0,00%
A11-b	0	0	0	0	0	0	0,00%
A3	10	0	0	0	0	0	0,00%
A9	10	0	0	0	0	0	0,00%
A10	10	0	1	0	1	2	66,67%
A4	50	0	0	0	0	0	0,00%
A6	50	0	4	0	0	4	80,00%
A7	50	0	3	0	0	3	75,00%
A2	100	3	0	1	1	5	71,43%
A5	100	1	2	1	0	4	80,00%
A13	100	1	0	3	1	5	100,00%
A1	150	0	1	3	1	5	100,00%
A8	150	0	4	ns	ns	4	100,00%
A14	150	2	0	3	ns	5	100,00%

A partir dos valores de mortes acumuladas foram estimados os valores de CL50 dos períodos de 48 horas (125,63 mg/L), 72 horas (68,38mg/L) (figura 9) e 96 horas (52,52 mg/L).

Figura 7. Estimativa da curva probit, no período de 72 horas

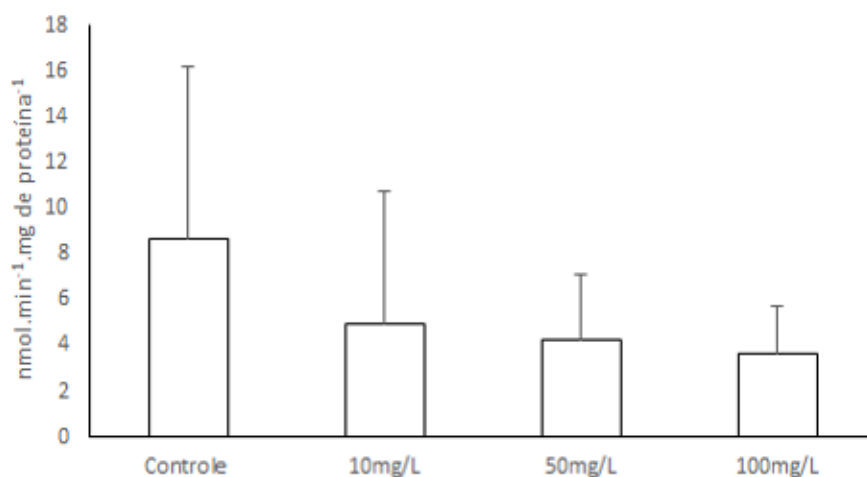


5.1.1 Colinesterase em hepatopâncreas e Músculo Ensaio CL 50

Foi realizada a análise da atividade da colinesterase em hepatopâncreas e músculo dos camarões sobreviventes a exposição em concentrações de 0, 10, 50, 100 mg/L glifosato ao final do ensaio de CL50. Como pode ser observado nos gráficos 1 e 2, não

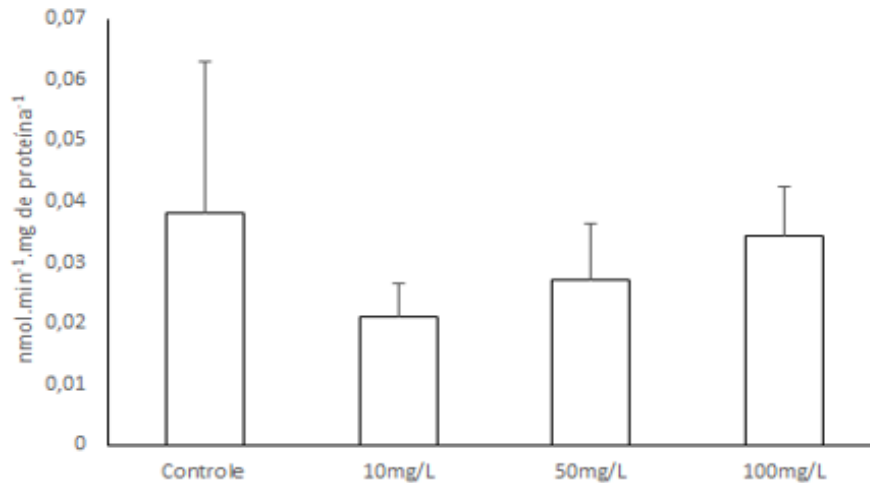
ocorreu alteração significativa da atividade da colinesterase no hepatopâncreas ($p=0,3621$) e no músculo ($p=0,0938$) entre os grupos do ensaio da CL50. Porém foi observado que os animais contaminados com glifosato apresentaram variação de comportamento, ocorrendo tendência a imobilização, com perda de equilíbrio e em alguns casos paralisia ao longo do período de 10 horas, com retorno ao comportamento normal após 24 horas.

Gráfico 1 – Atividade da Colinesterase em Hepatopâncreas de *M. rosenbergii* submetidos a ensaio de CL50, em concentrações de 0, 10, 50, 100 mg/L de glifosato no período de 96 horas, as barras correspondem a média e desvio padrão.



Fonte: A.Autora, 2018.

Gráfico 2 – Atividade da Colinesterase em Músculo de *M. rosenbergii* submetidos a ensaio de CL50, em concentrações de 0, 10, 50 e 100mg/L de glifosato no período de 96 horas, as barras correspondem a média e desvio padrão.

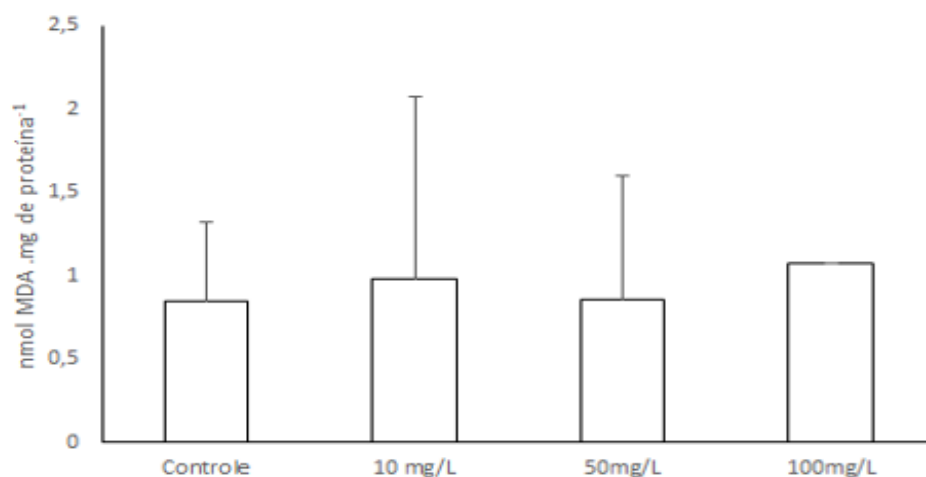


Fonte: A Autora, 2018.

5.1.2. LPO em Hepatopâncreas e Músculo Ensaio CL50

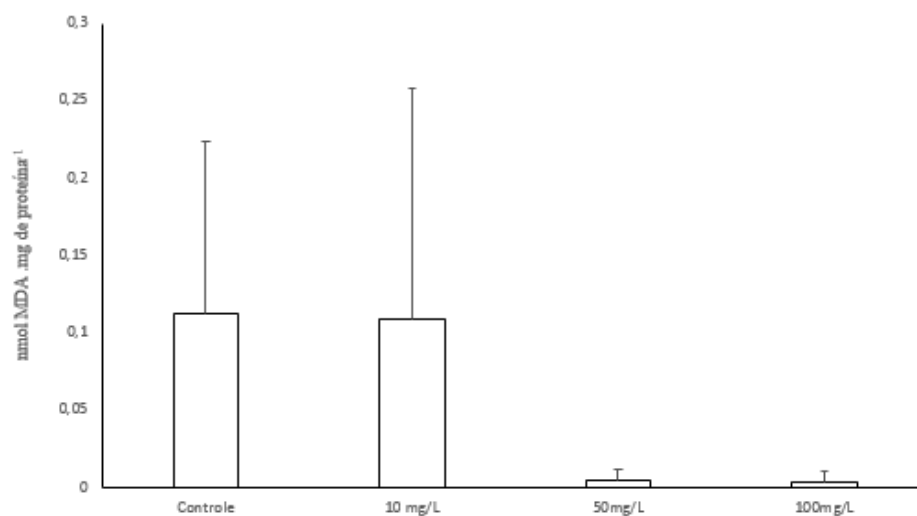
No ensaio da CL 50, com *M. rosenbergii* submetidos a concentrações de glifosato de 0, 10, 50 e 100 mg/L realizada análise da LPO em hepatopâncreas (Gráfico 3) e músculo (Gráfico 4), não ocorreu variação significativa entre os grupos experimentais e os controles, em hepatopâncreas ($p=0,8625$), já no músculo apesar de não ter ocorrido variação significativa ($p=0,1036$), se observou valores elevados de média entre os grupos controle e 10 mg/L de glifosato, quando comparados com os tratados de 50 e 100 mg/L de glifosato.

Gráfico 3 – LPO em Hepatopâncreas de *M. rosenbergii* submetidos a ensaio de CL50 em concentrações de 0, 10, 50, 100 mg/L de glifosato no período de 96 horas, as barras correspondem a média e desvio padrão.



Fonte: A.Autora, 2018.

Gráfico 4 – LPO em Músculo de *M. rosenbergii* submetidos a ensaio de CL50 em concentrações de 0, 10, 50, 100 mg/L de glifosato no período de 96 horas, as barras correspondem a média e desvio padrão.

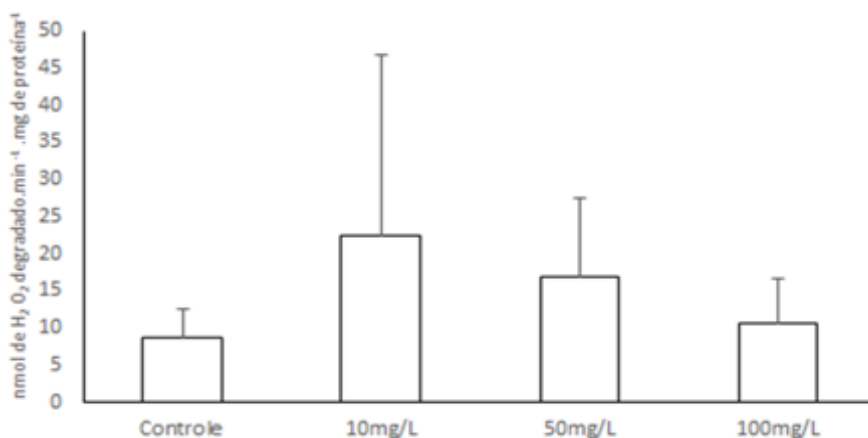


Fonte: A.Autora, 2018

5.1.3 Catalase em Hepatopâncreas e Músculo Ensaio CL50

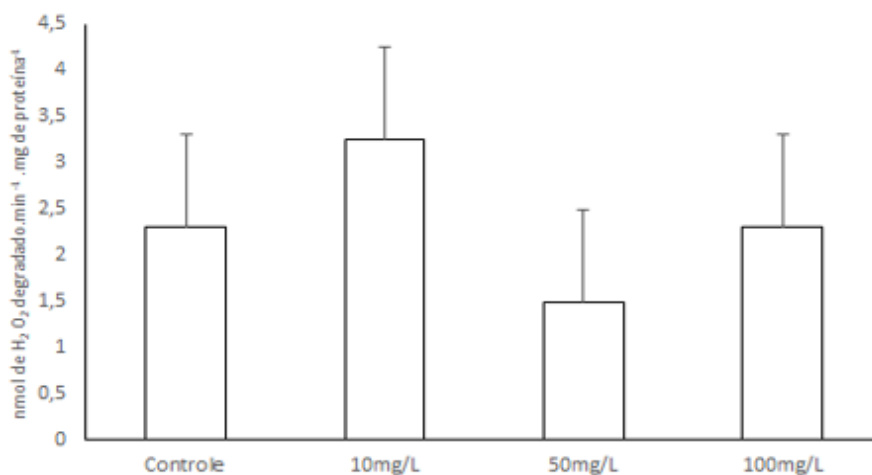
No ensaio CL50 com contaminação de *M. rosenbergii* com glifosato em concentrações de 0, 10, 50 e 100 mg/L, não houve variação significativa na atividade da Catalase em hepatopâncreas com $p=0,6106$ (Gráfico 5) e músculo com $p=0,1763$ (Gráfico 6).

Gráfico 5 - Atividade da Catalase em Hepatopâncreas de *M. rosenbergii* submetido a ensaio CL 50 em concentrações de 0, 10, 50, 100 mg/L de glifosato no período de 96 horas, as barras correspondem a média e desvio padrão.



Fonte: A.Autora, 2018.

Gráfico 6 -Atividade da Catalase em Músculo de *M. rosenbergii* submetidos a ensaio de CL50 em concentrações de 0, 10, 50, 100 mg/L de glifosato no período de 96 horas, as barras correspondem a média e desvio padrão.

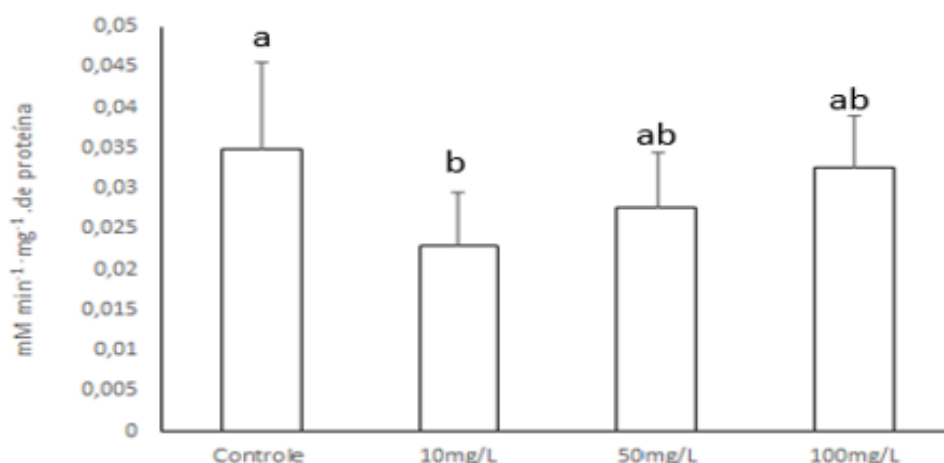


Fonte: A.Autora, 2018.

5.1.4 GST em Músculo Ensaio CL50

Em ensaio CL50 de contaminação de *M. rosenbergii* com glifosato em concentrações de 0, 10, 50 e 100 mg/L, foi realizada análise da atividade da enzima GST em músculo (Gráfico 7), ocorrendo variação significativa entre os grupos experimentais ($p=0,0369$). Os animais contaminados com 10 mg/L de glifosato apresentaram redução da atividade da enzima GST, porém os grupos de contaminação de 50 mg/L e 100 mg/L mantiveram atividade enzimática semelhante ao controle ($p < 0,05$).

Gráfico 7 – Atividade da GST em Músculo de *M. rosenbergii* submetidos a ensaio de CL 50 em concentrações de 0, 10, 50, 100 mg/L de glifosato no período de 96 horas, as barras correspondem a média e desvio padrão e os grupos experimentais com letras diferentes indicam diferenças estatísticas com $p < 0,05$.

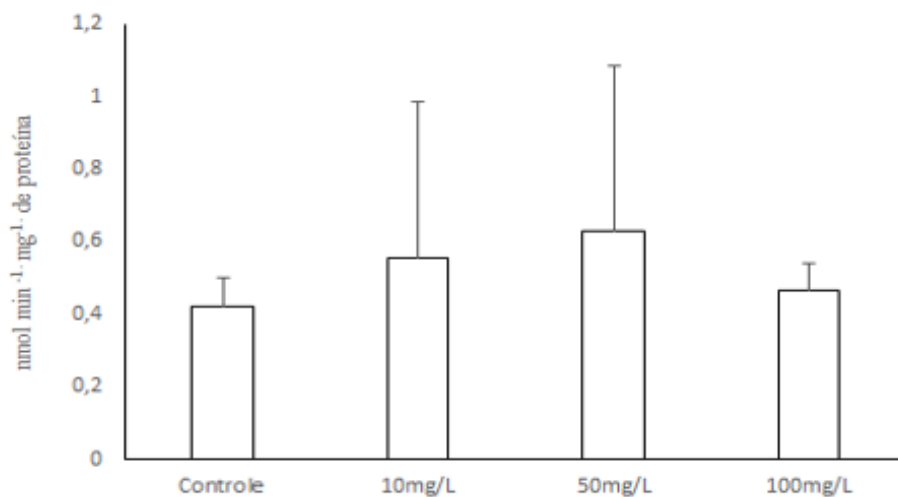


Fonte: A Autora, 2018.

5.1.5 GR em Músculo Ensaio CL 50

Em ensaio CL50 com *M. rosenbergii* contaminado com glifosato em concentrações de 0, 10, 50 e 100 mg/L, foi realizada análise da atividade da enzima GR em músculo (Gráfico 8), não ocorrendo variação significativa entre os grupos controle e experimentais com $p=0,7183$.

Gráfico 8 – Atividade da GR em Músculo de *M. rosenbergii* submetidos a ensaio de CL 50 em concentrações de 0, 10, 50, 100 mg/L de glifosato no período de 96 horas, as barras correspondem a média e desvio padrão.



Fonte: A Autora, 2018.

5.2 Ensaio Curto Prazo

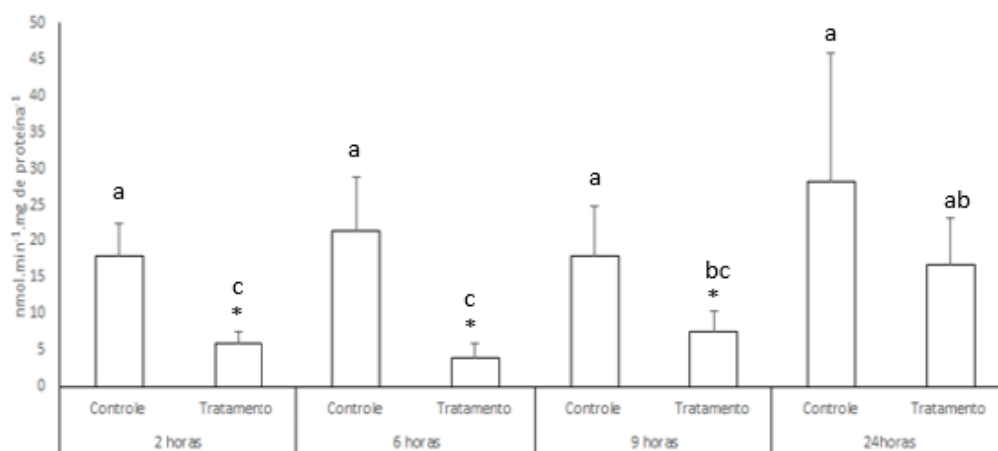
No ensaio de 24 horas de contaminação de camarões com glifosato (100 mg/L) não foi observado morte de animais. No período de 2 horas foi percebido agitação entre os animais submetidos ao glifosato. Em 6 horas após a contaminação foi observado que alguns animais apresentaram perda de equilíbrio e paralisia, em 9 horas observou-se a manutenção da paralisia, já em 24 horas de contaminação os animais submetidos ao composto apresentavam nível de atividade semelhante ao controle.

5.2.1 Colinesterase em Hepatopâncreas e Músculo Ensaio Curto Prazo

Em ensaio de 24 horas com *M. rosenbergii* contaminado com glifosato na concentração de 100 mg/L, foi realizada análise da atividade da enzima colinesterase em hepatopâncreas (Gráfico 9) e músculo (Gráfico 10). Em hepatopâncreas houve variação significativa entre os grupos experimentais ($p < 0.0001$). Foi observado redução da

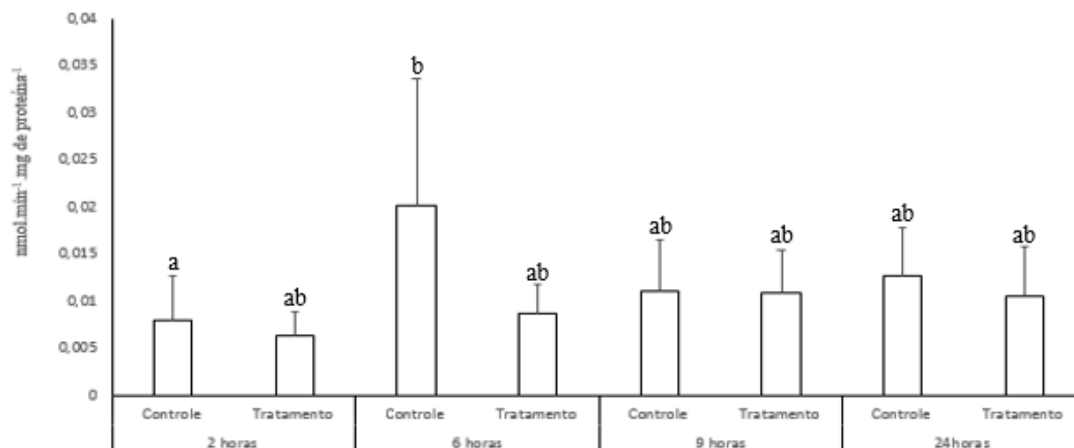
atividade da colinesterase nos grupos contaminados com glifosato, nos tempos de 2 h (58,27 % de inibição), 6 h (81,96 % de inibição) e 9 h (22,49 % de inibição) de contaminação, em comparação com os grupos controles dos mesmos períodos de ensaio, porém em 24 horas de contaminação, a atividade enzimática dos animais contaminados apresentou o mesmo nível observado nos animais do grupo controle. Não foi observada variação da atividade da enzima nos grupos controles ao longo das 24 horas de ensaio, porém observou-se variação da atividade da enzima nos grupos contaminados ao longo do tempo, ocorrendo redução da atividade ao longo do tempo de contaminação até 6 horas e aumento da atividade da enzima, dependente do tempo, até 24 horas, com variação significativa entre os tempos de 2 e 6 horas em relação ao grupo contaminado 24 horas. Os animais analisados após 9 horas de ensaio apresentaram valores de atividade enzimática intermediária. Em músculo não ocorreu variação significativa entre os grupos experimentais e controle entre os períodos de análise, porém houve diferença significativa entre experimentais e controle 2 horas e controle 6 horas ($p=0,0324$).

Gráfico 9 – Atividade da Colinesterase em Hepatopâncreas de *M. rosenbergii* submetidos a ensaio de curto prazo: concentração de 100 mg/L de glifosato no período de 24 horas, as barras correspondem a média e desvio padrão, os asteriscos indicam variação significativa ($p < 0,05$) entre grupo controle e contaminado do mesmo período e letras diferentes indicam diferenças significativas entre grupos experimentais ao longo do tempo.



Fonte: A. Autora, 2018.

Gráfico 10 – Atividade da Colinesterase em Músculo de *M. rosenbergii* submetidos a ensaio de concentração de 100 mg/L de glifosato no período de 24 horas, as barras correspondem a média e desvio padrão.

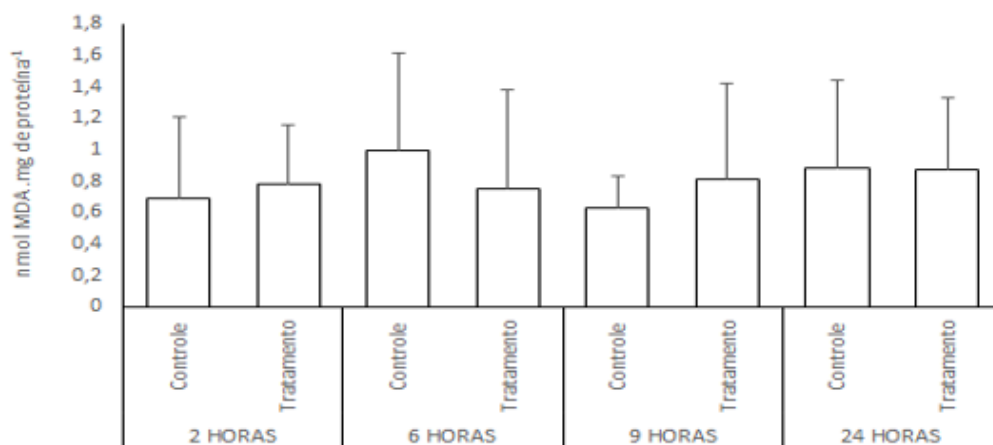


Fonte: A.Autora, 2018

5.2.2 LPO em Hepatopâncreas e Músculo Ensaio Curto Prazo

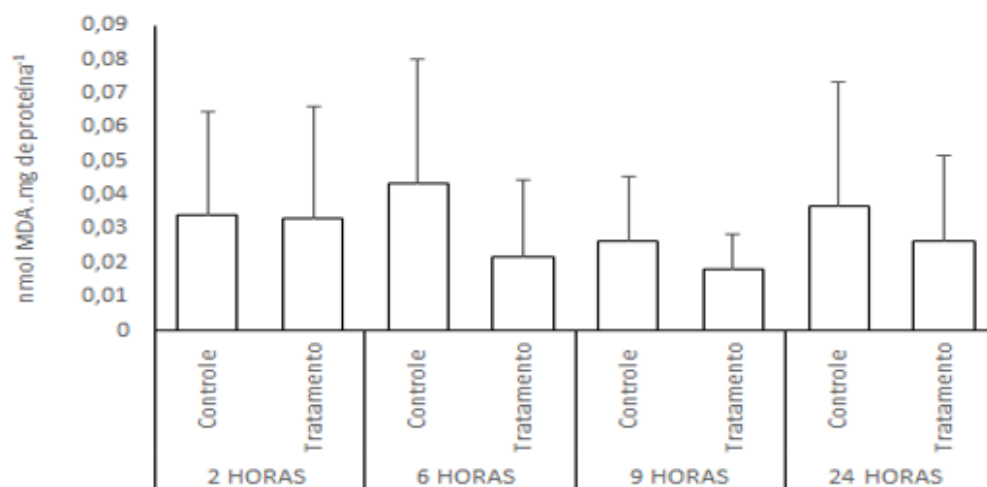
Em ensaio de 24 horas com *M. rosenbergii* contaminado com glifosato na concentração de 100 mg/L, foi realizada análise da LPO em hepatopâncreas (Gráfico 11) não ocorrendo variação significativa entre os grupos experimentais e controle em cada tempo de análise, assim como não foi identificado variação dentro dos grupos controles e contaminados com glifosato ao longo do tempo ($p=0,9557$). Em músculo (Gráfico 12) também não ocorreu variação significativa entre os grupos experimentais e controle ($p=0,4685$).

Gráfico 11 – LPO em Hepatopâncreas de *M. rosenbergii* submetidos a ensaio de concentração de 100 mg/L de glifosato no período de 24 horas, as barras correspondem a média e desvio padrão.



Fonte: A.Autora, 2018.

Gráfico 12 - LPO em Músculo de *M. rosenbergii* submetidos a ensaio de concentração de 100 mg/L de glifosato no período de 24 horas, as barras correspondem a média e desvio padrão.



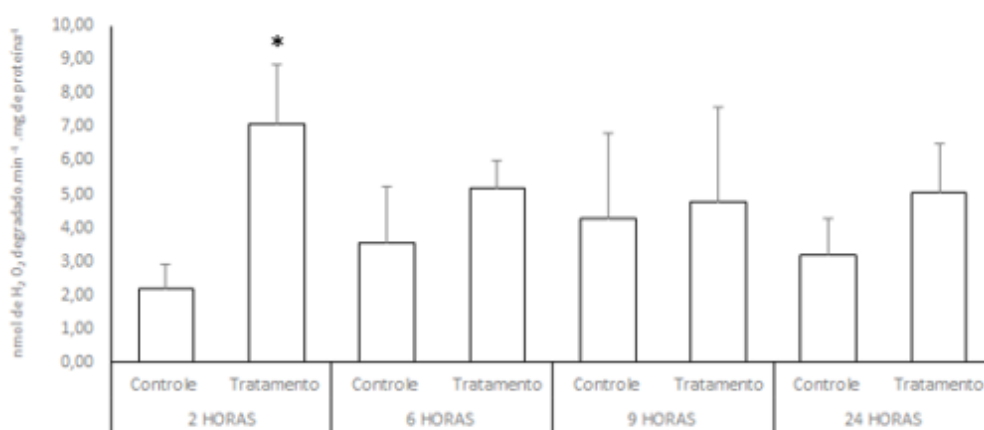
Fonte: A.Autora, 2018.

5.2.3 Catalase em Hepatopâncreas e Músculo Ensaio Curto Prazo

Em ensaio de 24 horas com *M. rosenbergii* contaminado com glifosato na concentração de 100 mg/L, foi realizada análise da atividade da enzima catalase em hepatopâncreas (Gráfico 13) e músculo (Gráfico 14). Em hepatopâncreas houve variação

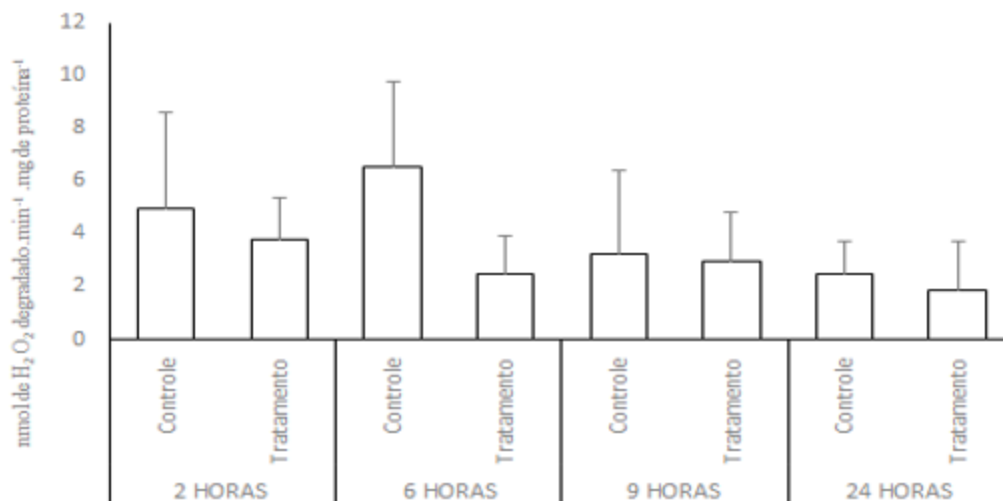
significativa entre os grupos experimentais ($p=0,0092$). Não ocorrendo variação na atividade da catalase do grupo controle ao longo dos tempos de análise do ensaio, porém nas primeiras 2 horas houve aumento da atividade da catalase dos animais submetidos ao glifosato em relação ao controle no mesmo período de ensaio, retornando aos níveis semelhantes ao controle nos demais tempos de análise. Já em músculo não ocorreu variação significativa entre os grupos experimentais e controle com $p= 0.1763$.

Gráfico 13– Atividade da Catalase em Hepatopâncreas de *M. rosenbergii* submetidos a ensaio de curto prazo: 100 mg/L de glifosato no período de 24 horas, as barras correspondem a média e desvio padrão, o asterisco representa diferença significativa entre o grupo contaminado e controle do mesmo período de ensaio.



Fonte: A.Autora, 2018.

Gráfico 14– Atividade Catalase em Músculo de *M. rosenbergii* submetidos a ensaio de curto prazo: 100 mg/L de glifosato no período de 24 horas, as barras correspondem a média e desvio padrão.



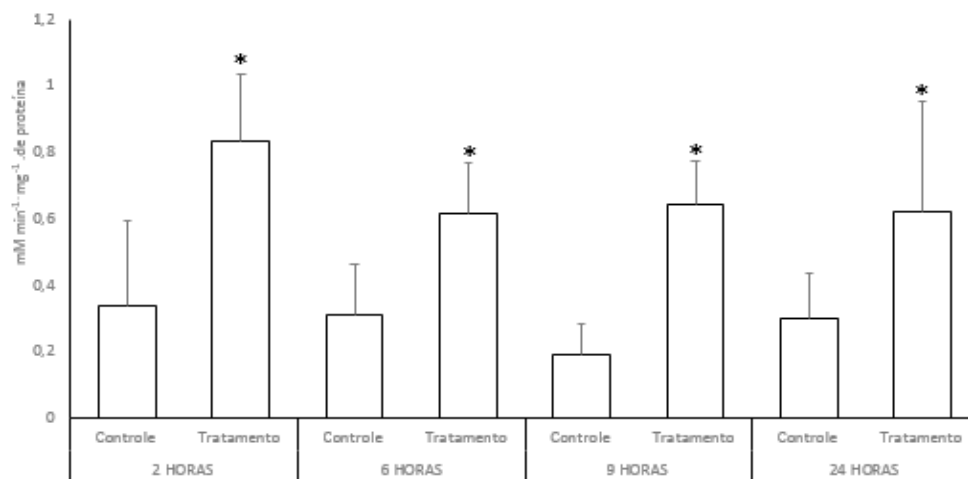
Fonte: A.Autora, 2018.

5.2.4 GST em Hepatopâncreas e Músculo Ensaio Curto Prazo

Em ensaio de 24 horas com *M. rosenbergii* contaminado com glifosato na concentração de 100 mg/L, foi realizada análise da atividade da enzima GST em hepatopâncreas (Gráfico 15) e músculo (Gráfico 16). Em hepatopâncreas houve variação significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,0001$). Não ocorreu variação na atividade da GST entre os grupos controles ao longo dos tempos de análise do ensaio, porém houve aumento da atividade da GST dos animais submetidos ao glifosato em relação ao controle no mesmo período de ensaio, nos tempos de 2, 9 e 24 horas.

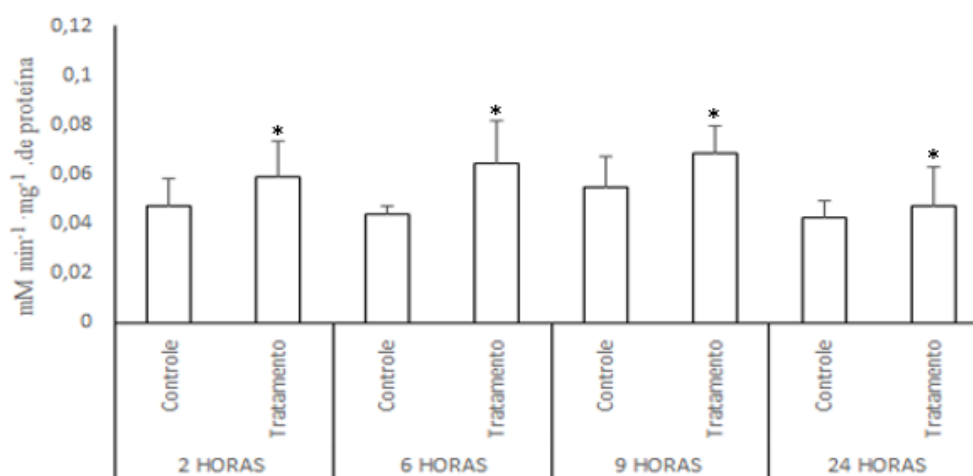
No músculo houve variação significativa entre os grupos experimentais ($p = 0,0040$). As médias de atividades da GST foram maiores em todos os grupos contaminados em relação aos controles.

Gráfico 15– Atividade da GST em Hepatopâncreas de *M. rosenbergii* submetidos a ensaio de curto prazo: 100 mg/L de glifosato no período de 24 horas, as barras correspondem a média e desvio padrão. Os asteriscos representam variações significativas entre o grupo controle e o grupo contaminado do mesmo período.



Fonte: A Autora, 2018.

Gráfico 16 – Atividade da GST em Músculo de *M. rosenbergii* submetidos a ensaio de curto prazo: 100 mg/L de glifosato no período de 24 horas, as barras correspondem a média e desvio padrão.



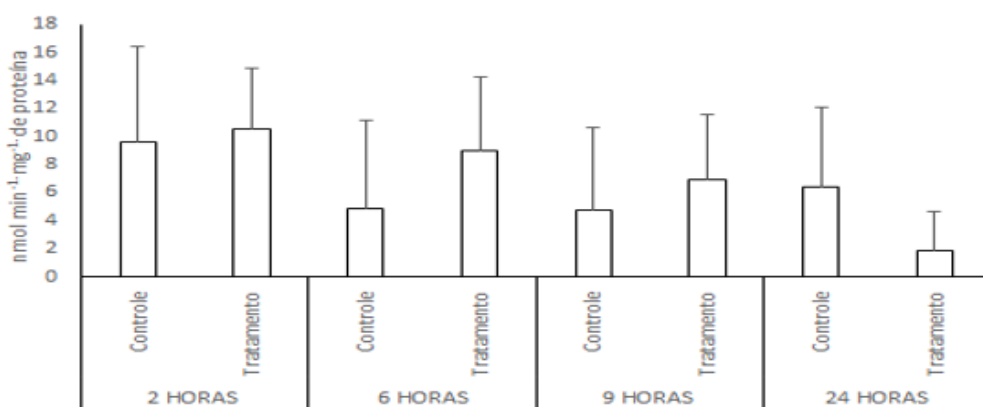
Fonte: A Autora, 2018.

5.2.5 GR em Hepatopâncreas e Músculo Ensaio Curto Prazo

Em ensaio de 24 horas com *M. rosenbergii* contaminado com glifosato na concentração de 100 mg/L, foi realizada análise da atividade da enzima GR em

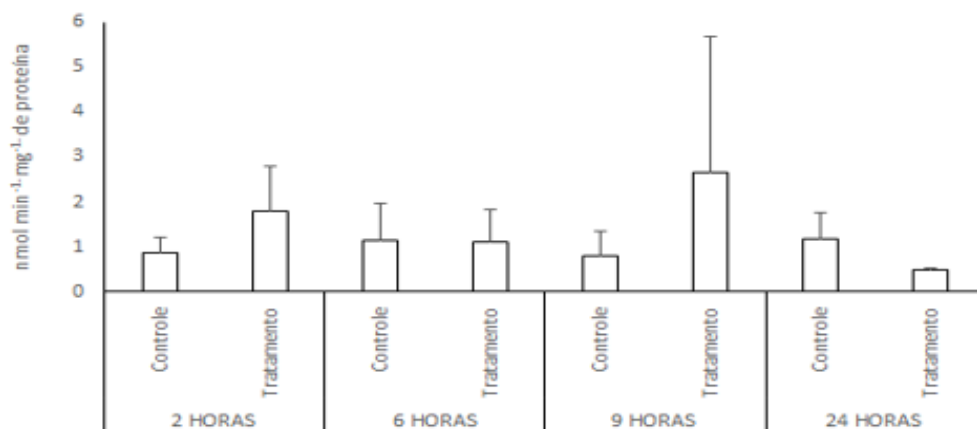
hepatopâncreas (Gráfico 17) e músculo (Gráfico 18), não havendo variação significativa entre os grupos experimentais e controle em cada tempo de análise, assim como não foi identificado variação dentro dos grupos controles e contaminados com glifosato ao longo do tempo, obtendo um $p=0,1921$ em hepatopâncreas e $p=0,2464$ em músculo.

Gráfico 17 – Atividade da GR em Hepatopâncreas de *M. Rosenbergii* submetidos a ensaio de curto prazo: 100 mg/L de glifosato no período de 24 horas, as barras correspondem a média e desvio padrão.



Fonte: A.Autora, 2018.

Gráfico 18 – Atividade da GR em Músculo de *M. rosenbergii* submetidos a ensaio de curto prazo: 100 mg/L de glifosato no período de 24 horas, as barras correspondem a média e desvio padrão.



Fonte: A.Autora, 2018.

6. DISCUSSÃO

Foi observado efeito do glifosato, dependente da concentração e do tempo de contaminação, sobre a sobrevivência de camarões da espécie *M. rosenbergii* submetidos as diferentes concentrações do composto ao longo das 96 horas de ensaio. Houve uma redução da CL50 com o aumento do tempo de exposição dos animais, 125,63 mg/L, 68,38mg/L e 52,52 mg/L, em 48, 72 e 96 horas, respectivamente. Esta diminuição da CL50 ao longo do tempo está relacionada a perda de capacidade de adaptação fisiológica dos animais à presença do contaminante, reduzindo, com isso, a capacidade de resistência dos animais ao glifosato e, portanto, aumentando a probabilidade de morte.

Poucas informações sobre o efeito letal do glifosato em crustáceos, são encontradas na literatura. Porém ensaios de CL50 em peixes demonstram grande variabilidade de sensibilidade ao composto, dependente da espécie estudada. Iguchi (2012), estudou a contaminação por glifosato do peixe *Geophagus brasiliensis*, determinando a CL50 96 horas, como sendo de 1,8 mg/L. Em bagre prateado (*Rhamdia quelen*), os autores estimaram a CL50, 96 horas do glifosato em 0,73 mg/L (KREUTZ et al., 2010). Em *Poecilia reticulata*, a CL50, 96 horas, foi estimada em 5,39 mg/L em 12 horas, 4,10 mg/L em 24 horas, 3,12 mg/L em 48 horas, 2,92 mg/L em 72 horas e 2,71 mg/L em 96 horas (SOUZA-FILHO, 2011). Para *Prochilodus lineatus* (curimba), foi a CL50 estimada foi de 20,84 mg/L em 6 horas, 17,32 mg/L em 24 horas e 13,69 mg/L em 96 horas (LANGIANO, 2006). Em *Prochilodus lineatus*, a CL50, 96 horas foi de 13,96 mg/L (LANGIANO e MARTINEZ, 2008). O trabalho realizado por Bastos (2013), avaliou a toxicidade do glifosato em cultivo de pós-larvas de Jundiá determinando a concentração efetiva mediana (CE₅₀) de 0,9 mg/L. Em larvas de anfíbios CL50 de 16 dias de glifosato, resultou na estimativa CL50 de 1,3 a 2,5 mg/L e para a rã madeira adulta a CL50 estimada foi de 1,32 mg/L sem presença de predadores e 0,55 mg/L com a presença de predadores (RELYEA, 2005).

Em crustáceos ensaios com glifosato foram relatados por Bastos (2013), que avaliou a toxicidade do glifosato em cultivo de *Daphnia magna* determinando a concentração efetiva mediana (CE₅₀) de 32 µg/L. Mensah et al., (2012), observaram que o herbicida glifosato causou redução da taxa de crescimento e aumento do número de mudas do camarão *Caridina nilótica*. Ali et al., (2018) estudaram a CL50 em 24 e 48 horas, dos compostos glifosato e malation em artêmia, obtendo os valores de 58.3 e 17.3

mg/L para malation e 28 e 19 µg/L para glifosato, respectivamente. Em estudo utilizando copépodos contaminados com Roundup®, foi observado maior mortalidade nos grupos expostos ao glifosato em concentrações de 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,6 mg/L quando comparado ao controle. A CL50 foi estimada para camarões *P. annae* em 48 horas (1,059 mg/L) e para *P. roux* 72 horas (107,53 mg/L) e 96 horas (60,97 mg/L) (DEEPANANDA et al., 2011).

Os resultados encontrados para a CL50 de *M. rosenbergii* indicam que esta espécie é sensível ao composto, porém apresenta-se relativamente resistente quando comparada a espécies de peixes, anfíbios e maioria dos crustáceos descritos na literatura, apresentando sensibilidade semelhante ao camarão da espécie *P. roux*. Moura (2009), em ensaios de CL50 das espécies de peixes *Oreochromis niloticus*, *Colossoma macropomum* e *Cyprinus carpio* contaminados com glifosato durante 96 horas, 21,63 mg/L, 15,33 mg/L e 20,06 mg/L respectivamente, indica que o risco de mortalidade em contaminação dessas espécies pode ser considerado baixo para regiões.

Em animais o glifosato inibe algumas funções enzimáticas, causa problemas crônicos no nascimento, além de possuir uma alta toxicidade para bactérias e fungos (AMARANTE JÚNIOR et al., 2002). Nos mamíferos efeitos tóxicos foram relatados em ratos (BENEDETTI et al., 2004) e humanos (GASNIER et al., 2009; THONGPRAKAISANG et al., 2013). Efeito do glifosato também foram relatados em invertebrados (CUHRA et al., 2015; DEEPANANDA et al., 2011; MENSAH et al., 2012; ALI et al., 2018), anfíbios (RELYEA, 2005; RISSOLI et al., 2016) e peixes (KREUTZ et al., 2010; LANGIANO e MARTINEZ, 2008; SOBJAK et al., 2017), demonstrando que animais aquáticos apresentam uma sensibilidade elevada ao glifosato.

Apesar de ausência de alteração da atividade da colinesterase nos camarões sobreviventes do ensaio de CL50 com glifosato, as alterações de comportamento observadas nos animais levaram ao questionamento da ausência de interferência do glifosato na atividade colinesterase. Os animais apresentaram um efeito de torpor, com paralisação do corpo sendo que esta mudança desapareceu após as 24 h. Segundo Cattaneo (2009) quando ocorre alta inibição da colinesterase, acontece paralisia nos animais, levando muitas vezes a morte. Para buscar mais dados para comprovar os resultados encontrados foi proposto o ensaio de acompanhamento da atividade da enzima colinesterase em hepatopâncreas e músculo de animais contaminados com 100 mg/L de glifosato, em curto prazo, ao longo de 24 horas.

Diversos estudos têm demonstrado a influência que agrotóxicos em geral sobre a fisiologia animal. Em especial os organofosforados e carbamatos apresentam uma grande interferência na atividade da acetilcolinesterase (SILVA, 2016). Apesar do composto glifosato ser considerado um organofosforado, efeitos neurotóxicos em peixes, relacionados à interferência do glifosato na atividade da acetilcolinesterase, ainda não são bem claros. Em estudo realizado por Guiloski et al., (2010) com o peixe *Corydoras paleatus* exposto ao inseticida carbaril ocorreu inibição da acetilcolinesterase muscular em 39% e cerebral de 64%, quando comparados ao controle, onde a enzima permaneceu inibida mesmo após 7 dias da exposição. Ainda, Arias et al., (2007), realizou estudos identificando que a exposição a organofosforados e carbamatos, muito utilizados na agricultura e também na saúde pública, gera a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) em peixes, mesmo em regiões mais industrializadas. Por outro lado, Lopes e Rosa (2012) utilizaram o peixe *Danio rerio* em estudo com exposição de glifosato por 24 horas, em concentrações de 5 mg/L e 10 mg/L demonstrando que a atividade da acetilcolinesterase não foi alterada nessas concentrações. Sanchez (2015) destaca que, diante de contaminação com glifosato, ocorre a inibição da acetilcolinesterase no músculo cardíaco apresentando inibição e diminuindo a contração.

O glifosato induz aumento de atividade da AChE em peixes *Anabas testudineus* e *Heteropneustes fossilis*, em 30 dias de exposição (PALAS et al., 2014). A indução da atividade enzimática, também foi observada para a espécie de peixe *Cyprinus carpio* (CATTANEO et al., 2011) e em músculo de *Leporinus obtusidens* (SALBEGO et al., 2010) quando expostos ao glifosato, porém uma ausência de interferência em tecido muscular e uma redução, dependente da concentração em tecido nervoso foi observada em animais da espécie *Leporinus obtusidens* (GLUSCZAK et al., 2006) e em *Cnesterodon decemmaculatus* houve redução da atividade em homogenato do corpo animal (MENÉNDEZ-HELMAN et al., 2012) em ensaios de 96 horas de exposição ao composto. Em embriões de *R. quelen* submetidos ao glifosato foi observado indução da atividade da acetilcolinesterase em 12 horas e inibição em 24 horas de contaminação (SOBJAK et al., 2017). A indução da atividade da AChE também foi detectada por Miron et al., (2005) em *R. quelen* expostos aos herbicidas clomazone, quinclorac e metil metsulfuron. Os autores sugerem que esta indução pode estar relacionada a uma compensação fisiológica ao estresse causado pela exposição aos agrotóxicos, aumentando a atividade colinesterásica, com aumento na hidrólise do neurotransmissor acetilcolina e

consequente decréscimo na ativação dos receptores nicotínicos e muscarínicos. A indução ou inibição da colinesterase pode influenciar no processo de neurotransmissão colinérgica e promover efeitos de letargia ou nado errático (MIRON et al., 2005). Estes estudos indicam que o tempo e a dose de exposição ao composto em questão são variáveis importantes a serem consideradas quando se trata de efeito tóxico, em especial, de alteração na atividade da acetilcolinesterase em diferentes tecidos dos animais.

Tu et al., (2009) demonstraram a interferência de endosulfan e deltametrina na atividade da AChE, com a inibição da enzima, no camarão-tigre-gigante (*Penaeus monodon*). Diclorvon inibiu a atividade da enzima na espécie de camarão *Palaemonetes pugio* (BOLTON-WARBERG et al., 2007). Bocquené e Galgani (1991) indicaram a inibição da AChE no camarão branco (*Palaemon serratus*) contaminados por fosalone e carbaril. Porém descrições da ação do glifosato sobre a atividade da acetilcolinesterase em camarão, e em especial em *M. rosenbergii* não foram encontradas na literatura.

Em ensaio de curto prazo com glifosato foi identificada alteração do comportamento dos animais ao longo das 24 horas e inibição crescente da atividade da enzima colinesterase nas seis primeiras horas de contaminação, com inibição máxima de 81,96 % da atividade do controle, porém a atividade enzimática foi gradualmente retornando aos níveis normais, tornando-se semelhante ao controle após 24 horas. Estes resultados estão de acordo com as mudanças de comportamento observadas nos animais durante o teste de CL50. Conforme observado no estudo realizado por Silva (2016), que realizou experimento com glifosato na concentração de 11,297 mg/L em *R. quelen* por período de 30 dias, observando que no período de contaminação os peixes tiveram dificuldade para se movimentar, se alimentar e nadar.

A presença de inibição da colinesterase em hepatopâncreas e ausência de alteração da atividade desta enzima em músculo dos camarões submetidos ao glifosato indicam uma possível diferença na atividade das enzimas presentes nos dois tecidos. Em mamíferos, a acetilcolinesterase, cuja função principal é degradar o neurotransmissor acetilcolina, é abundante em cérebro, músculo e membrana de eritrócitos. A butirilcolinesterase, cuja função ainda é pouco conhecida, mas parece estar envolvida em biotransformação de moléculas como os organofosforados, está presente principalmente em fígado, intestino, coração, rim e pulmões (ÖNEMI, 2003). Para confirmar a possibilidade de que a inibição identificada em colinesterase de hepatopâncreas de *M.*

rosenbergii está relacionada a butirilcolinesterase e portanto relacionada a biotransformação do glifosato, ensaios de caracterização da enzima, como identificação da sensibilidade à concentração de substrato e inibição por inibidores específicos, precisam ser realizados.

Outro efeito sobre a fisiologia de *M. rosenbergii* analisada foi sobre a defesa antioxidante. Não foram observados efeitos do glifosato sobre a LPO e a enzima GR de hepatopâncreas e músculo, assim como para atividade da catalase e GST de músculo, porém houve aumento da atividade da catalase hepatopancreática imediatamente após a contaminação, com retorno aos níveis normais após 6 horas. Ainda, efeitos bastante significativos com aumento da atividade da GST ao longo do período de ensaio, foram encontrados no hepatopâncreas dos animais submetidos ao glifosato.

De uma forma geral, os principais efeitos fisiológicos relatados para o glifosato foram o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS – Reactive Oxygen Species), tal como o íon superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radical hidroxila (-OH) (COGO et al., 2009; RONDÓN-BARRAGÁN et al., 2012), assim como alteração no sistema de defesa antioxidante (SOBJAK et al., 2017).

Armiliato (2014) estudou a contaminação por glifosato nos ovários do peixe *Danio rerio*, em concentração de 65 µg/L durante 96 horas, onde se observou aumento das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), o que significa que correu estresse oxidativo. Em teste utilizando 6,5 mg/L de glifosato, por períodos de 12, 24, 48 e 72 horas, com ovos de *R. quelen* foi constatado que no período de 72 horas ocorreu a maior sobrevivência dos indivíduos, juntamente com indução da GST, em 48 horas ocorreu indução da LPO, em 24 horas inibição da enzima colinesterase e indução da GR e em 12 horas indução das enzimas GR e colinesterase (SOBJAK, 2016).

Em estudo com o peixe *Danio rerio* em concentrações de 5 mg/L e 10mg/L de glifosato em 24 e 96 horas, ocorreu desequilíbrio do balanço oxidativo, além de alterar a atividade da acetilcolinesterase, ocorreu aumento antioxidante contra radicais peroxil na concentração de 5 mg/L em 24 horas de contaminação, redução da peroxidação lipídica na concentração de 10 mg/L também em 24 horas, e um aumento da peroxidação lipídica no músculo em 10 mg/L no período de 96 horas de contaminação (LOPES, 2014).

O glifosato induziu aumento de LPO e da atividade da enzima catalase em peixes *Anabas testudineus* e *Heteropneustes fossilis*, em 30 dias de exposição (PALAS et al.,

2014). Os autores concluem que o glifosato causa sérias alterações na atividade de enzimas, deteriorando a saúde dos animais (PALAS et al., 2014).

Em alevino de *R. quelen* expostos a um herbicida a base de glifosato apresentaram uma diminuição da atividade da catalase de 48% e aumento da GR de 472% quando comparado ao grupo controle, constatando que o glifosato quando comparado com os herbicidas parationato metílico e tebuconazole apresenta uma toxicidade menor para o *R. quelen* (FERREIRA, 2010). Shiogiri (2011), em experimento com o *Piaractus mesopotamicus* contaminado com roundup ready, obteve CL50 por período de 48 horas de 3,74mg/L, ocorrendo diminuição da SOD e da atividade da catalase, a LPO aumentou com a contaminação, diminuiu a atividade da acetilcolinesterase no cérebro. O peixe-zebra no estágio larval e adulto, foi submetido a contaminação com glifosato nas concentrações de 0,01 mg/L, 0,065 mg/L e 0,5mg/L em período de 96 horas, essa contaminação influenciou no comportamento agressivo do animal, prejudicando na locomoção, comportamento e morfologia do peixe (BRIDI, 2017).

O *Astyanax* sp. submetido a contaminação por Roundup ® e Hexaron WG ®, apresentou efeito de neurotoxicidade quando misturados, sugerindo um possível efeito potenciador, a atividade da GST aumentou, e a LPO apresentou dano de membrana o que se relaciona ao aumento da frequência de alterações nucleares, a atividade da enzima CAT diminuiu devido a inibição ou baixa produção (ROSSI, 2008).

Juvenis do peixe *P. lineatus*, foram contaminados com 1 mg/L de Roundup Transorb ® (RDT1), 5mg/L de Roundup Transorb ® e 10 mg/L de Roundup ®, por períodos de 6, 24 e 96 horas, os animais contaminados com RD em 24 horas tiveram redução da atividade da SOD e GPx e aumento da GSH, em 24 e 96 horas esse mesmo grupo apresentou aumento da LPO e da GST em relação ao controle de TR, já a acetilcolinesterase após 96 horas foi inibida no cérebro e após 24 e 96 horas inibida no músculo na contaminação com RD, no grupo RDT5 ocorreu redução da SOD em 6 horas e da CAT em 6 e 24 horas, no grupo RD5 a GST foi reduzida em 6 e 24 horas quando comparado ao grupo controle de RT, a LPO aumentou no grupo RDT1 em 6 horas de exposição, nesse grupo a acetilcolinesterase no cérebro foi inibida e no grupo RDT5 em 96 horas de contaminação (MODESTO, 2009).

O aumento transitório da atividade da enzima catalase em *M. rosenbergii*, nas duas primeiras horas de contaminação com o glifosato parece estar relacionada a um ajuste da

defesa antioxidante à presença do composto, e aparentemente foi suficiente para a manutenção dos níveis de espécies reativas de oxigênio dentro da normalidade, não sendo observada variação de lipoperóxidos no período de ensaio. Demonstrações de alteração da catalase como forma de defesa antioxidante foram identificadas em ensaios de contaminação de peixes com glifosato. *Prochilodus lineatus* contaminados com 10 mg/L de glifosato apresentaram aumento da atividade da catalase em 24 horas de contaminação (LANGIANO e MARTINEZ, 2008), *Anabas testudineus* e *Heteropneustes fossilis*, em 30 dias de exposição (PALAS et al., 2014). Redução da atividade dessa enzima, em animais submetidos ao glifosato, também foram relatadas em *P. lineatus* (MODESTO, 2009), *Astyanax* sp (ROSSI, 2008), *R. quelen* (FERREIRA, 2010). *Piaractus mesopotamicus* (SHIOGIRI, 2011). Porém não foram encontrados dados do efeito do glifosato sobre a atividade da catalase em crustáceos, ou especificamente em *M. rosenbergii*.

O aumento na atividade da GST em curto período de tempo com exposição ao glifosato em *M. rosenbergii* representa uma indução na reação de biotransformação do glifosato pela GST, reduzindo o efeito neurotóxico do contaminante. Isto está de acordo com o que afirma Trivella (2006), que a enzima tem capacidade de biotransformar substâncias químicas que são tóxicas para os organismos. A GST transforma compostos tóxicos em compostos conjugados com glutathione na forma reduzida (GSH) e tem, também, capacidade de inativar os EROs. Aumento da atividade da GST foi identificado em inúmeros ensaios de contaminação de glifosato em peixes (ROSSI, 2008; MODESTO, 2009; FERREIRA, 2010; SOBJAK, 2016). Já em outro estudo com glifosato em peixes *Anabas testudineus* e *Heteropneustes fossilis* ocorreu redução da atividade da enzima quando o ensaio foi realizado de forma crônica (30 dias de exposição) (PALAS et al., 2014) e em *Prochilodus lineatus* não foi observado alteração da atividade de GST em 6, 24 e 96 horas de contaminação. Porém, relatos do efeito do glifosato sobre a defesa antioxidante e biotransformação em camarões não foram encontrados.

Os valores de CL50 encontrados para *M. rosenbergii* contaminados com glifosato indicam que o glifosato é tóxico para a espécie incluindo esta espécie no grupo de organismos aquáticos sensíveis ao composto. Porém indica que *M. rosenbergii* é relativamente resistente ao glifosato quando comparado a espécies de peixes e crustáceos cuja sensibilidade já foi testada. A inibição da colinesterase, relacionada a alteração de motilidade e ao aumento na atividade da GST quando os animais foram expostos a

curto período de contaminação, indicam que há, simultaneamente à inibição da colinesterase, uma indução de reação de biotransformação do glifosato via GST, reduzindo, com isso, o efeito neurotóxico do glifosato, com retorno a atividade da colinesterase e do comportamento natatório aos níveis observados nos animais controles. Apesar destes efeitos, aparentemente, serem agudos e transitórios, em ambiente de cultivo ou em ambiente natural, estas alterações fisiológicas e comportamentais podem aumentar o risco de mortalidade, podendo alterar a estrutura da população ou causar prejuízo na produção.

7. CONCLUSÃO

Com o ensaio da CL50 foi possível determinar que a concentração de 150 mg/L de glifosato é letal para o *M. rosenbergii*, ocasionando a morte de 100% dos indivíduos submetidos a essa concentração.

A CL50 estimada para o *M. rosenbergii* submetido a contaminação com glifosato em concentrações de 10, 50, 100 e 150 mg/L em 96 horas foi de 125,63 mg/L, 68,38mg/L e 52,52 mg/L em 48 horas, 72 horas e 96 horas respectivamente.

Concentrações de 10 mg/L de glifosato por 96 horas diminui a atividade da GST. Porém não interfere nas atividades da GST em concentrações de 50 e 100 mg/L e de colinesterase, GR e LPO nas concentrações de 10, 50 e 100 mg/L.

A contaminação com glifosato causa perda de equilíbrio e paralisia de *M. rosenbergii* nas primeiras horas após a contaminação retornando ao comportamento normal após 24 horas de exposição ao composto.

A exposição de *M. rosenbergii* ao glifosato causa inibição da colinesterase de hepatopâncreas nas primeiras horas de contaminação, com um máximo de inibição ocorrendo aproximadamente após 6 horas e retorno aos níveis normais de atividade após 24 horas.

O glifosato induz o aumento da atividade da catalase de hepatopâncreas em período logo após a contaminação (2 horas), porém esta indução não é permanente, retornando logo após as primeiras horas, ao nível normal de atividade da enzima.

O glifosato induz o aumento da atividade da GST de hepatopâncreas de *M. rosenbergii* em período de 24 horas de contaminação, porém inibição da atividade da enzima foi observada em músculo de animais submetidos a concentração de 10 mg/L do composto durante 96 horas.

Os dados obtidos durante os dois ensaios realizados demonstram que a contaminação com glifosato causa efeitos letais, comportamentais e bioquímicos nos animais, podendo afetar a eficiência na produção da espécie em ambientes rurais.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.** v. 105, p. 121-126, 1984.
- ANNETT, R.; HABIBI, H. R.; HONTELA, A. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. **J. Appl. Toxicol.** n. 34, p. 458-479, 2014.
- ARAÚJO, C. R. M., SANTOS, V. L. A., GONSALVES, A. A. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. **Revista Virtual de Química.** Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina-PE, v.8, n. 6, p. 1818-1834,2016.
- ARIAS, A. R. L., BUSS, D. F., ALBURQUERQUE, C., INÁCIO, A. F., Freire, M. M., EGLER, M., MUGNAI, R., BAPTISTA, D. F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. Rio de Janeiro -**RJ. Ciência & Saúde Coletiva**, p. 61-72,2007.
- ARMILIATO, Neide. **Toxicidade Celular e Bioquímica do Glifosato Sobre os Ovários do Peixe *Danio rerio***.2014. 109 f. Tese - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.
- ALBINATI, A. C. L.; MOREIRA, E. L. T.; ALBINATI, R. C. B.; CARVALHO, J. V.; SANTOS, G. B.; LIRA, A. D. Toxicidade aguda do herbicida roundup® para piauçu (*Leporinus macrocephalus*). **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.8, n.3, p. 184-192, 2007.
- AMARANTE, O. P. J.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Glifosato: Propriedades, Toxicidade, Usos e Legislação. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, n.23(4), p.629-643, jul./ago. 2010.
- BARREIROS. A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse Oxidativo: Relação Entre Geração de Espécies Reativas e Defesa do Organismo. **Quim. Nova**, Salvador, v. 29, n. 1, p. 113-123. 2006.

BASTOS, Denise Nascimento. **Toxicidade do herbicida glifosato em *Daphnia magna* e pós-larvas de *Rhamdia quelen***. 2013. 39 f. Dissertação - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2013.

BENEDETTI, A. L.; VITURI, C. D. L.; TRENTIN, A. G.; DOMINGUES, M. A. C.; ALVAREZ-SILVA, M. The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide Glyphosate-Biocarb®. **Toxicology Letters**, Florianópolis, n. 153, p. 227–232, 2004.

BOCQUENÉ, G.; GALGANI, F. Acetylcholinesterase activity in the common prawn (*Palaemon serratus*) contaminated by carbaryl and phosalone: choice of a method for detection of effects. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Nantes, v.22, n.3, p.337-444, 1991.

BOLTON-WARBERG, M.; COEN, L. D.; WEINSTEIN, J. E. Acute toxicity and acetylcholinesterase inhibition in grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) and oysters (*Crassostrea virginica*) exposed to the organophosphate dichlorvos: laboratory and field studies. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** v.52, n.2, p.207-216, 2007.

BORTOLETTO, F. S., TROMBETA, N. C., Neves, E. M. **Uso de herbicidas no Brasil: Taxa de crescimento e demanda relativa no decênio 1999-2008**. ESALQ/USP, Graduação em Eng. Agrônômica (2010).

BRIDI, Daiane. **Efeito da Exposição ao Glifosato Sobre Parâmetros Comportamentais em Peixe-Zebra (*Danio rerio*)**. 2017. 71 f. Dissertação - Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

CALBERG, I.; MANNERVIK, B. (1985). Glutathione reductase from rat liver. **Methods Enzymol.** v. 113, p. 484-490.

COGO, Antônio, JD; SIQUEIRA Arthur F; RAMOS, Alessandro, C; CRUZ, Zilma; Silva, Ary, G. (2009) Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. **Natureza on line** 7 (1): 37-42. [on line] <http://www.naturezaonline.com.br>.

CONSTANTINO, Larissa de Souza. **Avaliação do Estresse Oxidativo em *Geophagus brasiliensis*, expostos a Agrotóxicos em Cultura de Arroz Irrigado, no Município de Araranguá, SC**. 2007. 40 f. TCC - Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, Criciúma, 2007.

DAFRE, A. L. **Biomarcadores Bioquímicos: Vantagens e Limitações Técnicas**. In: XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, Porto de Galinhas – PE, 2012. p. 1.

DEEPANANDA, K.H.M.A.; GAJAMANGE, D.; SILVA, W.A.J.P.; WEGIRIYA, H.C.E. Acute toxicity of a glyphosate herbicide, Roundup®, to two freshwater crustaceans. **J. Natl. Sci. Found. Sri Lanka**, n.39, p. 169-173, 2011.

DUDA, Naila Cristina Blatt. **Estresse Oxidativo**. Seminário apresentado a disciplina Bioquímica do Tecido ANIMAL. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Professor responsável Félix H. D. González. 2013.

FEDERICI, G.; SHAW, B.J.; HANDY, R.D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, v. 84, p. 415-430, 2007.

FERREIRA, Daiane. **Parâmetros de Estresse Oxidativo e Estudo de Lesões Histopatológicas em Jundiás (*Rhamdia Quelen*) Expostos a Agroquímicos**. 2010. 55 f. Dissertação – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

FIGUEIREDO, Lucas Gallat. **Biomarcadores de Estresse Oxidativo em Crustáceos Decápodos de Diferentes Ambientes do Estuário da Baía de Marajó, Pará**. 2016. 50 f. Dissertação - Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca, Belém, 2016.

FREIRE, Julliany Lemos; SILVA, Bianca Bentes. Aspectos Sócio-Ambientais das Pescarias de Camarões Dulciolas (*Macrobrachium Amazonicum* Heller, 1862 e *Macrobrachium Rosenbergii* de Man, 1879) (Decapoda, Palaemonidae) na Região Bragantina - Pará – Brasil. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, Bragança, 51-62, 2008.

GASNIER, C.; DUMONT, C.; BENACHOUR, N.; CLAIR, E.; CHAGNON, M.C.; SÉRALINI, G.E. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. **Toxicology**, n. 262, p. 184–191, 2009.

Gerência Geral de Toxicologia- GGTOX; Diretoria de Autorização e Registro Sanitários-DIARE; Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Considerações sobre os**

estudos de Toxicidade Inalatória (CL50 inalatória) para fins de classificação toxicológica de produtos agrotóxicos. www.anvisa.gov.br , Brasília,2016.

GLUSCZAK, L.; MIRON, S. D.; CRESTANI, M.; FONSECA, B. M.; PEDRON, A. F.; DUARTE, M. F.; VIEIRA, V. L. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. n.65, p. 237-241, 2006.

GOODMAN, GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005.

GUIMARÃES, G. L. Impactos Ecológicos do Uso De Herbicidas ao Meio Ambiente, **Série Técnica IPEF**, Piracicaba, v.4, n.12, p.159 – 180, Set. 1987.

GUILOSKI, I. C., SILVA, E. G., NISHIKAWA, C. M., ASSIS, H. C. S. Atividade da colinesterase em cérebro e músculo de *Corydoras paleatus* (Pisces, Teleostei) expostos ao carbaril. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.**, Curitiba, v. 8, n. 4, p. 461-468, 2010.

HABIG, W.H.; PABST, M. J.; JACOBY, W. B. (1976). Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mescapturic acid formation. **J. Biol. Chem.** v. 249, p. 7130-7139.

HARAYASHIKI, Cyntia Ayumi Yokota. **Efeitos Tóxicos Do Herbicida Roundup No Peixe *Poecilia vivipara* (Bloch e Schneider, 1801)**. 2013. 52 f. Dissertação - Universidade Federal Do Rio Grande – FURG, Rio Grande, 2013.

IGUCHI, Erika Yuri. **Alterações comportamentais em *Geophagus brasiliensis* submetidos à ação do herbicida glifosato**. 2012. 22 f. Monografia - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

KREUTZ, L.C.; GIL BARCELLOS, L.J.; MARTENINGHE, A.; SANTOS, E.D.; ZANATTA, R. Exposure to sublethal concentration of glyphosate or atrazine-based herbicides alters the phagocytic function and increases the susceptibility of silver catfish fingerlings (*Rhamdia quelen*) to *Aeromonas hydrophila* challenge. **Fish Shellfish Immunol.** n. 29, p. 694–697, 2010.

LANGIANO, Vivian do Carmo. **Toxicidade do Roundup® e seus efeitos para o peixe Neotropical *Prochilodus lineatus***. 2006. 72 f. Dissertação – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

LANGIANO, V. D. C.; MARTINEZ, C.B.R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comp. Biochem. Physiol.** n. 147, p. 222–231, 2008.

LOPES, Fernanda Moreira., ROSA, Carlos Eduardo. Efeito da Exposição ao Herbicida Glifosato Sobre a Atividade da Enzima Acetilcolinesterase do Peixe *Danio rerio*. **XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia**, Porto de Galinhas – PE, 2012.

LOPES, Fernanda Moreira. **Efeito da exposição ao herbicida glifosato sobre parâmetros bioquímicos, moleculares e espermáticos do peixe *Danio rerio***. 2014. 71 f. Dissertação - Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, 2014.

MENEZES, Charlene Cavalheiro. **Parâmetros de estresse oxidativo em Jundiás (*Rhamdia quelen*) Expostos a Formulações Comerciais dos Herbicidas Glifosato e Clomazone**. 2010. 86 f. Dissertação – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

MENÉNDEZ-HELMAN, R. J.; FERREYROA, G. V.; SANTOS, A. M.; SALIBIÁN, A. Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*. **Bull Environ Contam Toxicol**. Argentina, v.88, n. 1, p. 6-9, Jan. 2012.

MENSAH, P. K.; MULLER, C. G.; PALMER, C. G. Using growth measures in the freshwater shrimp *Caridina nilotica* as biomarkers of Roundup pollution of South African freshwater systems. **Physics and Chemistry of the Earth**. p. 262-268, 2012.

MODESTO, Kathya Assmann. **Efeitos de dois herbicidas à base de glifosato para um peixe neotropical, com enfoque nos biomarcadores bioquímicos**. 2009. 80 f. Dissertação - Universidade Estadual de Londrina, Curso de Ciências Biológicas, Londrina, 2009.

MORAES, P.V.D.; ROSSI. Comportamento ambiental do glifosato, **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 9, n. 3, p 22-35, 2010.

MOTA, W.M.; BARROS, M.L.; CUNHA, P.E.L.; SANTANA, M.V.A.; STEVAM, C.S.; LEOPOLDO, P.T.G., FERNANDES, R.P.M. **Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais**. *Rev. Bras. Pl. Med*: v.14, n.4, p.624-628, 2012, Botucatu.

MOURA, Emerson Eduardo Silva. **Determinação da Toxicidade Aguda e Caracterização de Risco Ambiental do Herbicida Roundup (Glifosato) sobre três Espécies de Peixes.**2009. 58 f. Dissertação - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

NEW, Michael. **Farming fresh water prawns**, A manual for the culture of the giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). FAO, 2002.

NEGRINI, Celma. **Criação de Juvenis de Camarão de Água Doce *macrobrachium rosenbergii* em Diferentes Densidades de Estocagem em Sistema de bioflocos.**2014, 44 f. Dissertação – Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2014.

NEW, M.B., D'ABRAMO, L.R., VALENTI, W.C., SINGHOLKA, S. 2000. Sustainability of fresh water prawn culture. In: New, M. B., Valenti, W. C. 2000. **Freshwater Prawn Culture**. Blackwell Science, USA.

OLIVEIRA, Rubem Silvério. Jr., Professor Adjunto, Capítulo 6 - **Introdução ao Controle Químico**. Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá, 2017.

ÖNEMI, Y. F. Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. **Turkish Journal of Biochemistry**; v. 28, n.2, p. 54-61. 2003.

PALAS, S.;SANDIPAN, P.;ALOKE, K. M.;APURBA, R.G. Biochemical effects of glyphosate based herbicide, Excel Mera 71 on enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE), lipid peroxidation (LPO), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and protein content on teleostean fishes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**.v. 107, p. 120-125, September, 2014.

PEREIRA, Lindalva. **Efeito dos Herbicidas Clomazone e Ametrina em Parâmetros Funcionais da Espécie de Peixe Neotropical *Prochilodus lineatus*.** 2012.100 f. Tese - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2012.

PERSCH, Tanilene Sotero Pinto. **Efeito dos herbicidas Roundup®, Primoleo® e Facet® sobre o metabolismo intermediário, o estresse oxidativo e a sobrevivência de *Rhamdia quelen* em diferentes fases de desenvolvimento.** 2015. 109 f. Tese - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PORTO ALEGRE, 2015.

PETRONILHOA, E. C., PINTO, A. C., VILLARA J. D. F., **Acetilcolinesterase: Alzheimer e Guerra Química**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.

PIANCINI, Laercio Dante Stein. **Múltiplos Biomarcadores Utilizados na Avaliação do Potencial Tóxico de Dois Herbicidas (Atrazina e Mesotriona), de Forma Isolada e Combinada, em Duas Espécies de Ciclídeos após Exposição Aguda**. 2015. 129 f. Tese - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

PINHEIRO, Marcelo Antônio Amaro, HEBLING, Nilton José. **Biologia de *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879)**, 1998. p. 21-46.

RELYEA, R.A. The Lethal Impacts of Roundup and Predatory Stress on Six Species of North American Tadpoles. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** n. 48, p. 351–357, 2005.

RISSOLI, R.Z.; ABDALLA, F.C.; COSTA, M.J.; RANTIN, F.T.; MCKENZIE, D.J.; KALININ, A.L. Effects of glyphosate and the glyphosate based herbicides Roundup Original® and Roundup Transorb® on respiratory morphophysiology of bullfrog tadpoles. **Chemosphere**. n. 156, p. 37–44, 2016.

ROSSI, Stéfani. **Uso de Biomarcadores para a Detecção de Efeitos Subletais dos Pesticidas Roundup® e Hexaron® em *Astyanax* sp. (Pisces, Teleostei)**. 2008. 65 f. Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SANCHEZ, Jessica Andrea Albañil. **Efeitos comparativos de herbicidas à base de glifosato sobre parâmetros oxidativos e qualidade espermática no peixe estuarino *Jenynsia multidentata***. 2015. 63 f. Dissertação - Universidade Federal do Rio Grande, Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Rio Grande, 2015.

SHIOGIRI, Natália Sayuri. **Toxicidade e Alterações Morfofuncionais em Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) Exposto ao Herbicida Roundup Ready**. 2011. 80 f. Dissertação – Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2011.

SPADOTTO, C.A. **Uso de Herbicidas no Brasil**. Comitê de Meio Ambiente, Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas. 2002. [online]Disponível:<http://www.cnpma.embrapa.br/herbicidas/> [Acessado em dd/mm/aaaa].

SILVA Ana Cecília Abreu. **Biomarcadores de Contaminação Ambiental**. 2016, 72 f. Dissertação - Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2016.

SILVA, Marianne Pires da. **Efeitos da Exposição ao Glifosato Sobre Biomarcadores de Estresse Oxidativo em Jundiás (*Rhamdia quelen*)**. 2016. 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, 2016.

SOARES, D. F. FARIA, A. M. ROSA, A. H. Análise de risco de contaminação de águas subterrâneas por resíduos de agrotóxicos no município de Campo Novo do Parecis (MT), Brasil. **Eng Sanit Ambient**, Ituiutaba, v.22, n.2, p. 277-284, mar/abr. 2017.

SOBJAK, Thaís Maylin. **Atividade do Sistema antioxidante e efeitos neurotóxicos de *rhamdia* sp.: experimentos manipulativo e natural**. 2016. 67 f. Dissertação - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2016.

SOUZA, Rodrigo Espinosa. **Monitoramento da Lagoa da Conceição, Florianópolis, SC, utilizando biomarcadores de estresse oxidativo em *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) como indicadores de poluição aquática**. 2010. 78 f. Dissertação - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

SOUZA FILHO, José de. **Efeitos tóxicos e genotóxicos do herbicida Roundup Transorb em Guppy (*Poecilia reticulata*) submetido a tratamento agudo**. 2011. 159 f. Dissertação - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

STURM, A. SILVA DE ASSIS, H. C., HANSEN, P.-D. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potencial use in the monitoring of neurotoxic contamination. **Mar. Env. Res.** v. 47, p. 389 – 398, 1999

THONGPRAKAI SANG, S.; THIAN TANAWAT, A.; RANGKADILOK, N.; SURIYO, T.; SATAYAVIVAD, J. Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. **Food Chem. Toxicol.** n. 59, p. 129–136, 2013.

TRIVELLA, Daniela Barretto Barbosa. **Purificação e Caracterização da Glutathione-S-Transferase (E.C. 2.5.1.18) de Brânquias de Ostras *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING, 1828)**. 2006. 89 f. Dissertação - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2006.

TU, H. T.; SILVESTRE, F.; SCIPPO, M. L.; THOME, J. P.; PHUONG, N. T.; KESTEMONT, P. Acetylcholinesterase activity as a biomarker of exposure to antibiotics and pesticides in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Ecotoxicology Environmental Safety**, Namur, v. 72, p.1463-1470, 2009.

VALENTI, W. C. Aquicultura sustentável. In: **Congresso de Zootecnia**, 12º, Vila Real, Portugal: Associação Portuguesa dos Engenheiros Zootécnicos. Anais...p. 111-118.2002.

VALENTI, W.C.; DANIELS, W.H.2000. Recirculation hatchery systems and management . In: NEW, M. B. and VALENTI, W.C. Freshwater prawn culture: the farming of *Macrobrachium rosenbergii*.**Oxford: Blackwell Science**. p. 69-90, 2000.

WEBSTER, T. M.U.; Laing, L. V.; FLORANCE, H.; Santos, E. M. Effects of Glyphosate and its Formulation, Roundup, on Reproduction in Zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Science Technologii**. v. 48, p. 1271–1279, 2014.

WILKENS, Anike Liedtke Lauffer. **Efeito dos Herbicidas Boral® 500 Sc e Glifosato ® Isolados em Mistura Sobre o Balanço Oxidativo, os Níveis de Glicose e de Corticosterona de *Rana catesbeiana***. 2017. 83 f. Dissertação - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2017.